



Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Wydział Biologii

Instytut Biologii Eksperymentalnej

Zakład Botaniki Ogólnej

Kornel Mateusz Michalak

ROZPRAWA DOKTORSKA

Charakterystyka mechanizmów różnicowania
elementów przewodzących floemu u roślin

Promotor: prof. UAM dr hab. Agnieszka Bagniewska-Zadworna

Promotor pomocniczy: dr Natalia Wojciechowska

Poznań 2024



Adam Mickiewicz University in Poznan

Faculty of Biology

Institute of Experimental Botany

Department of General Botany

Kornel Mateusz Michalak

DOCTORAL DISSERTATION

Characterization of the mechanisms
of conductive phloem element differentiation in plants

Supervisor: Dr. Agnieszka Bagniewska-Zadworna

Assistant supervisor: Dr. Natalia Wojciechowska

Poznan 2024

Dziękuję mojej Pani Promotor, prof. UAM dr hab. Agnieszce Bagniewskiej-Zadwornej,
za spełnienie jednego z największych moich marzeń, czyli za możliwość pracy na Uczelni. Jestem niezmiernie wdzięczny za przekazaną wiedzę naukową, a także czuję się zaszczycony przez ofiarowany mi ogrom starań. Dziękuję za brak zwątpienia, nawet gdy ja sam w siebie wątpiłem. Wiele zawdzięczam słowom uznania, ale i krytyki oraz wspólnym przeżywaniu sukcesów, jak i porażek. Dzisiaj doceniam obowiązek dokładności, ciężar skrupulatności oraz korzyści płynące z bezzwłocznego działania i wysokich wymagań.

Dziękuję mojej Pomocniczej Pani Promotor, dr Natalii Wojciechowskiej,
za nieocenione wsparcie we wszystkich eksperymentach. Zawsze starałem się korzystać z niesamowitego doświadczenia i inspirowałem się tą wielką pracowitością. Jestem też po prostu wdzięczny, za olbrzymią pomoc. Gdy czułem, że jestem prawie pusty w środku jak rurka sitowa, Natalia była niczym komórka towarzysząca mająca siły za nas oboje.

Dziękuję wszystkim moim bliskim,
mam ogromne szczęście, że mam ich tak wielu. Jestem wdzięczny za wsparcie, zrozumienie, dodawanie otuchy, wspólnie spędzony czas i znoszenie moich narzekań.

Finansowanie:

Pracę doktorską sfinansowano w ramach:

- projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (NCN) OPUS nr 2020/39/B/NZ3/00018 „Znaczenie autofagii selektywnej i autolizy w procesie floemogenezy: Identyfikacja i charakterystyka jej kluczowych etapów”; kierownik: prof. UAM dr hab. Agnieszka Bagniewska-Zadworna;



N A R O D O W E C E N T R U M N A U K I

- Grantu Doktoranckiego z programu "UNIWERSYTET JUTRA POWR 03.05.00-00-00-Z303/17"; kierownik: Kornel Michalak;



- projektu „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” Wsparcie publikowania w prestiżowych czasopismach naukowych 121/08/POB2/0004; kierownik Kornel Michalak.



Spis treści

Streszczenie	1
Abstract	2
Wykaz skrótów.....	4
Wykaz opublikowanych i nieopublikowanych prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.....	5
Wprowadzenie.....	6
Omówienie wyników	11
Wnioski i podsumowanie	17
Bibliografia.....	20
Manuskrypt nr 1 wraz z oświadczeniami	23
Manuskrypt nr 2 wraz z oświadczeniami	93
Publikacja nr 3 wraz z oświadczeniami	135

Streszczenie

W toku ewolucji rośliny wykształciły tkanki przystosowane do efektywnego transportu substancji. Drewno (ksylem) przewodzi wodę i sole mineralne przez elementy trachealne, natomiast komórki przewodzące łyka (floemu) to elementy sitowe rozprowadzające produkty fotosyntezy. Różnicowanie tych komórek polega na ich dostosowaniu do niezakłóconego przepływu roztworów przez redukcję cytoplazmy i modyfikację ściany komórkowej. W rozwój komórek przewodzących ksylemu zaangażowane są mechanizmy programowanej śmierci komórki (PCD – ang. *Programmed Cell Death*), prowadzącej do powstania martwych elementów trachealnych o silnie zgrubiałych ścianach. Co ciekawe, analogicznie komórki ze zubożalym protoplastem wykształcane są także podczas floemogenezy. Na drodze różnicowania elementy sitowe pozbawiane są większości organelli, w tym jądra komórkowego, jednak pozostają żywe, zachowując część cytoplazmy skupionej blisko ściany komórkowej. Dotychczas niewiele było wiadomo na temat procesów odpowiedzialnych za częściową i wysoce selektywną redukcję protoplastu podczas floemogenezy.

Głównym procesem odpowiedzialnym za usuwanie struktur cytoplazmatycznych jest autofagia, a jej występowanie podczas ksylogenezy potwierdziły liczne prace naukowe. Niewiele wiadomo jednak o roli autofagii selektywnej w rozwoju łyka. Celem pracy była weryfikacja hipotezy badawczej zakładającej, że w różnicowanie komórek przewodzących łyka zaangażowane są procesy degradacyjne, ale ich działanie jest selektywne i nie prowadzi do lizy całego protoplastu, tak jak w przypadku PCD podczas rozwoju komórek przewodzących drewna. Materiałem badawczym były korzenie roślin modelowych. W oparciu o analizy anatomiczne, cytologiczne i molekularne scharakteryzowano mechanizmy odpowiedzialne za redukcję cytoplazmy w elementach sitowych korzeni topoli kalifornijskiej (*Populus trichocarpa* Torr. et A. Gray ex Hook.). Zidentyfikowano także cytologiczne i molekularne markery autofagii występujące podczas floemogenezy. Ponadto, analizując korzenie innych gatunków oddalonych ewolucyjnie, od paproci do dwuliściennych, udowodniono, że autofagia to proces specyficzny dla różnicowania zarówno drewna i łyka roślin naczyniowych. Nie stwierdzono natomiast specyficznego wzorca ewolucji dla składu ściany komórkowej tkanek przewodzących. W porównaniu do konserwatywnego charakteru autofagii, formowanie ściany komórkowej tkanek przewodzących jest bardzo zmienne. Dla każdego z badanych gatunków udokumentowano różny skład ściany komórkowej dla ksylemu bądź floemu. W pracy zaproponowano także wzory mechanizmów degradacyjnych u roślin w warunkach ich

prawidłowego rozwoju oraz w reakcji na stres abiotyczny i biotyczny. Różnicowanie ksylemu i floemu zachodzące w wyniku śmierci komórki lub tylko częściowego zaniku organelli stanowi bardzo dobry model badawczy dla mechanizmów odpowiedzialnych za intensywne zmiany w składzie cytoplazmy i ściany komórkowej. Uzyskane wyniki znacząco poszerzyły dotychczasową wiedzę na temat różnych ścieżek selektywnej degradacji cytoplazmy oraz metod ich badania.

Słowa kluczowe: autofagia selektywna, floem, elementy sitowe, PCD, ksylem, elementy trachealne

Abstract

In the course of evolution, plants have developed tissues adapted to the efficient transport of substances. Xylem conducts water and mineral salts through tracheal elements, while phloem conducting cells known as sieve elements, distributing products of photosynthesis. The differentiation of these cells involves the adaptation to ensure the uninterrupted flow of solutions by reducing the cytoplasm and modifying the cell wall. Programmed Cell Death (PCD) mechanisms are involved in the development of xylem conducting cells. In the case of xylogenesis, tracheary elements become dead, therefore empty, and their walls become extensively thickened. Interestingly, analogically cells with reduced protoplast are formed during phloemogenesis as well. In the course of differentiation, sieve elements are deprived of most organelles, including the nucleus, but they remain alive, retaining part of the cytoplasm concentrated close to the cell wall. So far, little has been known about the processes responsible for the partial and highly selective reduction of the protoplast during phloemogenesis.

The main process responsible for the removal of cytoplasmic structures is autophagy, and its occurrence during xylogenesis has already been confirmed. However, little is known about the role of selective autophagy in the development of phloem. The aim of the work was to verify the research hypothesis, assuming that degradative processes are involved in the differentiation of phloem conductive cells, but their operation is selective and does not lead to the lysis of the entire protoplast, as is the case of PCD during the development of xylem conducting cells. The research material consisted of the roots of model plants. Using the black cottonwood (*Populus trichocarpa* Torr. et A. Gray ex Hook.) as well as anatomical, cytological and molecular analyses, the mechanisms responsible for the reduction of cytoplasm in sieve

elements were characterized. Cytological and molecular markers of autophagy occurring during phloemogenesis were also identified. Moreover, by analyzing the roots of other evolutionarily distant species, ranging from ferns to dicotyledons, it was proven that autophagy is a process specific to the differentiation of both the xylem and phloem in vascular plants. However, no specific evolutionary pattern was found for the composition of the cell walls of conducting tissues. Compared to the conserved nature of autophagy, cell wall formation is very variable. For each examined species, different cell wall composition for xylem or phloem were documented. The thesis also proposes patterns of degradation mechanisms in plants under conditions of their normal development and in response to abiotic and biotic stresses. The differentiation of xylem and phloem, undergoing in the result of cell death or just partial reduction of organelles, is a very good research model for the mechanisms responsible for intensive changes in the composition of the cytoplasm and cell wall. The obtained results significantly extended the current knowledge on different pathways of cytoplasmic selective degradation and methods of their study.

Key words: selective autophagy, phloem, sieve elements, PCD, xylem, tracheary elements

Wykaz skrótów

PCD – programowana śmierć komórki (ang. *Programmed Cell Death*)

ATG – białka związane z autofagią (ang. *AuTophaGy-related*)

ATG – geny związane z autofagią (ang. *AuTophaGy-related*)

ER – retikulum endoplazmatyczne

AGP – białka arabinogalaktanu (ang. *ArabinoGalactan Proteins*)

Wykaz opublikowanych i nieopublikowanych prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Manuskrypt nr 1

Michalak K. M., Wojciechowska N., Kułak K., Minicka J., Jagodziński A. M., Bagniewska-Zadworna A. *Is autophagy always a death sentence? A case study of highly selective cytoplasmic degradation during phloemogenesis* (w recenzji)

Manuskrypt nr 2

Michalak K. M., Bagniewska-Zadworna A. *Exploring specific degradation processes of plant cell components. Vascular tissues reveal that there is more than selective autophagy* (przygotowane do wysłania)

Publikacja nr 3

Michalak K. M., Wojciechowska N., Marzec-Schmidt K., Bagniewska-Zadworna A. 2024. *Conserved autophagy and diverse cell wall composition: Unifying features of vascular tissues in evolutionarily distinct plants*. *Annals of Botany* 133: 559-572.

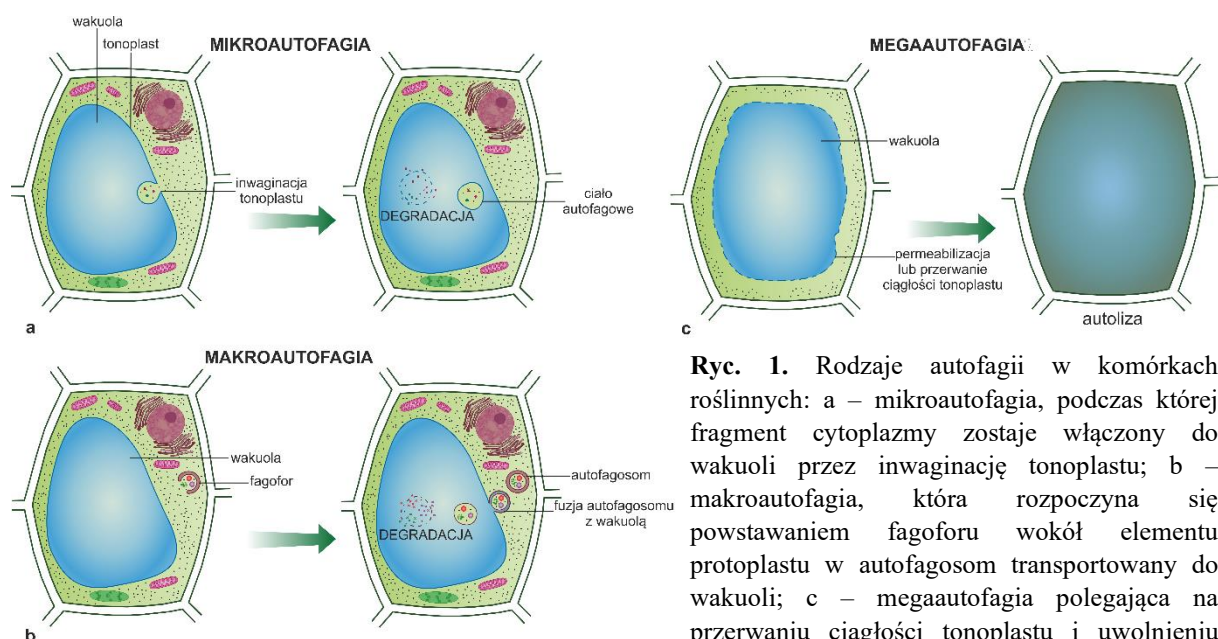
Wprowadzenie

Konieczność efektywnego transportu substancji jest pokłosiem ewolucji od organizmów jednokomórkowych do organizmów o złożonej organizacji, jakimi są rośliny, u których organy wyspecjalizowane w przeprowadzaniu fotosyntezy znajdują się w dużej odległości od organów absorbujących wodę i składniki mineralne. Konieczna jest zatem zaawansowana dystrybucja substancji, zarówno od donorów fotoasymilatów do korzeni, jak i wody ze składnikami mineralnymi z korzeni do liści przez łodygę. W transporcie kluczową rolę odgrywają tkanki przewodzące, których cechy strukturalne sprawiają, że są wyspecjalizowane do pełnienia tej funkcji (Niklas, 2016). Komórki tworzące tkanki przewodzące mają wspólne pochodzenie, ale wyraźnie zróżnicowaną strukturę, są zatem tkankami niejednorodnymi (Ye, 2002, Fukuda, 2004, Scarpella i Meijer, 2004). W ich skład wchodzi drewno (ksylem) i łyko (floem). Drewno składa się z elementów trachealnych tworzących naczynia lub cewki odpowiedzialne za transport wody i soli mineralnych; miękiszu drzewnego zapewniającego łączność z innymi tkankami oraz włókien pełniących funkcję wzmacniającą (Evert, 2006b, Venturas i in., 2017). Komórki przewodzące floemu to elementy sitowe tworzące ciągi rurek sitowych rozprowadzających produkty fotosyntezy, a także różne cząsteczki, takie jak mRNA, białka i fitohormony. W zależności od grupy taksonomicznej, jak i organu, w łyku można także wyróżnić miękisz łykowy, pośredniczący w transporcie cukrów do rurek sitowych z tkanek asymilujących. Występują również nieliczne przyrurkowe komórki towarzyszące, charakteryzujące się gęstą cytoplazmą z licznie występującymi mitochondriami, zapewniającymi ciągłość dostarczania energii podczas transportu substancji. Funkcję wzmacniającą w łyku pełnią włókna łykowe, występujące przeważnie w łodygach i korzeniach o budowie wtórnej (Evert, 1977, Evert, 2006a). Tkanki przewodzące złożone są z komórek o różnej budowie i wynikających z niej funkcjach. Zasadniczą jednak rolą ksylemu i floemu jest efektywny transport, a wieloszlakowa zmiana struktury komórek tworzących naczynia i rurki sitowe polega na przystosowaniu do niezakłóconego przepływu roztworów (Lucas i in., 2013). Z uwagi na znaczenie w procesach rozwojowych oraz fizjologicznych na poziomie całej rośliny, problematyka budowy, funkcji i zróżnicowania tych tkanek stanowi przedmiot wielu badań naukowych (Ohtani i in., 2017). Wyjątkowy, wciąż wymagający szczegółowego poznania, jest również sam przebieg różnicowania elementów przewodzących. Proces ten, zwany w przypadku ksylemu ksylogenezą, a w przypadku floemu floemogenezą, wymaga wielu przemian i dostosowań strukturalnych, gwarantujących niezakłócony transport.

Rozwój komórek przewodzących wiąże się ze zmniejszeniem zawartości cytoplazmy, jest więc zależny od wewnątrzkomórkowych szlaków degradacyjnych. Intensywny transport substancji związany jest również z koniecznością modyfikacji ściany komórkowej w celu jej wzmocnienia. Zapewnia to nie tylko ich wytrzymałość oraz dostosowanie składu związków do pełnionej funkcji, ale również determinuje kształt komórek przewodzących (Lucas i in., 2013). W wyniku różnicowania ksylemu elementy trachealne stają się martwe i puste, a sam proces rozwojowy określany jest jako przykład programowanej śmierci komórki (PCD - ang. *Programmed Cell Death*) (van Doorn i in., 2011, Van Durme i Nowack, 2016). Podczas rozwoju ściana komórkowa elementów trachealnych ulega wyraźnemu pogrubieniu i wysyceniu ligniną (Mellerowicz i Sundberg, 2008). Elementy sitowe pozbawione są natomiast większości organelli w pełnej dojrzałości, ale co ciekawe pozostają żywe. Na drodze ich różnicowania degradacji ulegają wakuole, aparat Golgiego, a nawet jądro, natomiast w centrum dojrzałych rurek sitowych zostaje zachowana cytoplazma o wyraźnie zredukowanej gęstości elektronowej. Ponadto, przyściennie w komórkach przewodzących łyka pozostają nieliczne plastydy, mitochondria i fragmenty retikulum endoplazmatycznego oraz pęcherzyki i filamenty białka P (Evert, 1977, Evert, 2006a). Zatem proces degradacji wydaje się w tym wypadku być wysoce selektywny. W odróżnieniu od elementów trachealnych, ściana komórkowa elementów sitowych nie podlega tak intensywnym modyfikacjom podczas różnicowania (Mullendore i in., 2010). Z uwagi na złożoność procesu, jak do tej pory, mechanizmy regulujące degradację struktur cytoplazmatycznych w komórkach łyka pozostają nieznane, zaś różnicowanie tego typu doczekało się odrębnego określenia, tj. „połowiczna śmierć komórki” (ang. *programmed cell semi-death*) (van Bel, 2003). W dostępnej literaturze brak jest bowiem pogłębionych rozważań czy doniesień o czynnikach warunkujących utrzymanie tych komórek przy życiu, pomimo rozpadu wakuoli i jądra komórkowego.

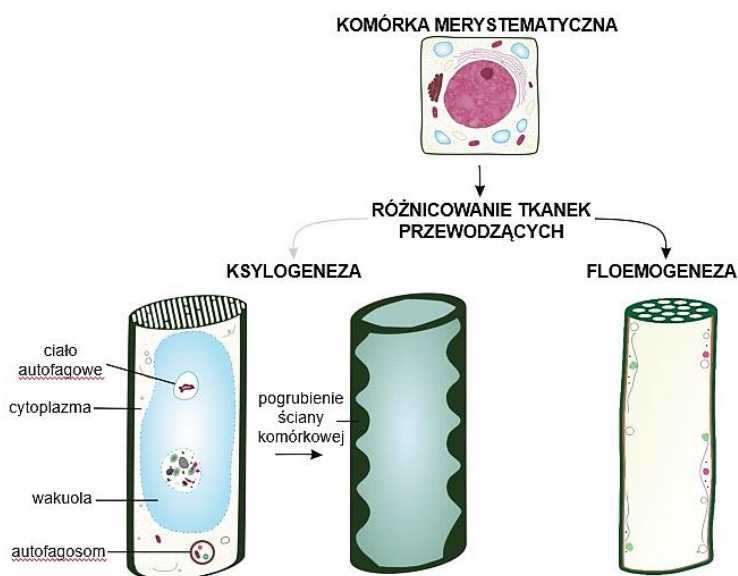
PCD odgrywa kluczową rolę w różnicowaniu tkanek, jest istotna na poziomie całego organizmu, jak i w jego reakcji na czynniki zewnętrzne. Mimo destrukcyjnego charakteru, proces ten jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania roślin, regulując m.in. rozwój tkanek składających się z martwych komórek i starzenie organów (Kuriyama i Fukuda, 2002). Głównym mechanizmem zaangażowanym w PCD, umożliwiającym eliminację zbędnych struktur komórkowych, jest autofagia (gr. *autós* – samo, *phágia* – zjadanie). U roślin można zwykle wyróżnić trzy typy tego procesu, wszystkie jednak prowadzą do wewnątrzkomórkowego rozkładu cząsteczek, a nawet całych organelli (van Doorn i Woltering, 2010). Pierwszym rodzajem autofagii jest mikroautofagia, zazwyczaj rozpoczynająca się wpukleniem tonoplastu wraz z niewielkim fragmentem cytoplazmy, po czym następuje

utworzenie pęcherzyka wewnątrz wakuoli (Ryc. 1a). Kolejny typ to makroautofagia, podczas której z fragmentu błony powstaje fagofor, który rozwija się wokół elementu przeznaczonego do degradacji w pęcherzyk o podwójnej błonie – autofagosom. Szlak ten obejmuje również transport autofagosomu do wakuoli, prowadząc do uwolnienia pęcherzyka z fragmentem cytoplazmy (Ryc. 1b). Przebieg makroautofagii jest kontrolowany przez białka ATG (ang. *AuTophagy-related*), spośród których jedynie ATG8 występuje w obu błonach fagoforów i autofagosomów na wszystkich etapach autofagii. Z tego względu zostało uznane jako molekularny marker procesu makroautofagii. Pęcherzyki o różnej zawartości, pochodzące z mikro- lub makroautofagii to ciała autofagowe, które zostają strawione w soku wakuolarnym. Procesy te mogą zachodzić jednocześnie w każdej komórce, zapewniają jej homeostazę usuwając wyeksploatowane struktury i zbędne cząsteczki oraz biorą udział w biogenezie wakuoli. Kiedy jednak komórka zostaje wprowadzona na ścieżkę PCD, tak jak w przypadku ksylogenezy, aktywność mikro- i makroautofagii jest wzmożona, a kulminacyjnym etapem tego procesu jest meгааautofagia prowadząca do lizy całego protoplastu. Podczas jej przebiegu dochodzi do zwiększenia objętości centralnej wakuoli i permeabilizacji lub pęknięcia tonoplastu. Po uwolnieniu enzymów hydrolitycznych do cytoplazmy występuje masowe trawienie pozostałego protoplastu (Ryc. 1c). Nie jest to jednak końcowy etap floemogenezy, gdyż elementy przewodzące łyka, choć pozbawione jądra pozostają żywe (Wojciechowska i in., 2021).



Ryc. 1. Rodzaje autofagii w komórkach roślinnych: a – mikroautofagia, podczas której fragment cytoplazmy zostaje włączony do wakuoli przez inwaginację tonoplastu; b – makroautofagia, która rozpoczyna się powstawaniem fagoforu wokół elementu protoplastu w autofagosom transportowany do wakuoli; c – meгааautofagia polegająca na przerwaniu ciągłości tonoplastu i uwolnieniu enzymów hydrolitycznych, co prowadzi do autolizy (Wojciechowska N., Michalak K. M., Bagniewska-Zadworna A. 2021).

Wszystkie trzy typy autofagii są odpowiedzialne za różnicowanie elementów trachealnych (Bagniewska-Zadworna i in., 2012, Bagniewska-Zadworna i in., 2014, Wojciechowska i in., 2019). Natomiast podczas różnicowania komórek przewodzących floemu zaobserwowano dotychczas jedynie mikroautofagię. Mimo braku znaczącego wzrostu aktywności enzymów litycznych, centralna wakuola degradowała, a fragmenty tonoplastu były obserwowane w dojrzałych elementach sitowych (Wang i in., 2008, Yang i in., 2015). Podczas obserwacji jądra w komórkach przewodzących floemu nie odnotowano jednakże występowania dużej centralnej wakuoli. Udokumentowano natomiast wiele małych wakuoli ulegających zanikowi. Nie obserwowano ich bowiem w dojrzałych elementach sitowych (Furuta i in., 2014). Mimo różnic w degradacji wakuoli, makroautofagia została zasugerowana jako krytyczny proces degradacyjny zaangażowany w różnicowanie obu tkanek przewodzących (Ryc. 2). Białko ATG8 zostało zlokalizowane w rozwijających się elementach przewodzących, zarówno ksylemu, jak i floemu (Wojciechowska i in., 2021).



Ryc. 2. Różnicowanie tkanek przewodzących. Proces ksylogenezy jest związany z aktywacją mechanizmów PCD, co obejmuje mikro- i makroautofagię. W ostatnim etapie tonoplast pęka, doprowadzając do autolizy. Dojrzałe elementy trachealne są martwe, puste i o zgrubiałych ścianach komórkowych. Po zróżnicowaniu elementy sitowe tracą większość organelli, ale pozostają żywe. Prawdopodobnie autofagia odpowiada za selektywną degradację cytoplazmy podczas floemogenezy (na podstawie Wojciechowska N., Michalak K. M., Bagniewska-Zadworna A. 2021, zmodyfikowane).

Makroautofagia, będąc zatem jednym z mechanizmów degradacyjnych charakterystycznym dla rozwoju ksylemu, zapewnia także eliminację części zawartości komórek bez konieczności ich uśmiercania, czyli może działać w sposób selektywny. Wysoce prawdopodobne jest zatem, że autofagia selektywna determinuje proces floemogenezy. Nadrzędnym celem przedstawionej rozprawy doktorskiej było poszerzenie wiedzy dotyczącej rozwoju floemu oraz zweryfikowanie hipotezy głównej zakładającej, że **procesy degradacyjne są zaprogramowane genetycznie podczas różnicowania elementów przewodzących floemu, ale ich działanie jest wysoce selektywne i ulega zatrzymaniu, zapobiegając lizie**

całego protoplastu w porównaniu do programowanej śmierci komórki (PCD) podczas rozwoju elementów przewodzących ksylemu.

W celu weryfikacji hipotezy, przeprowadzone zostały cztery zadania badawcze:

1. Opracowanie strategii, umożliwiających identyfikację kluczowych etapów floemogenezy;
2. Identyfikacja cytologicznych i molekularnych markerów autofagii w rozwoju elementów sitowych;
3. Analiza procesów degradacyjnych uczestniczących w redukcji zawartości cytoplazmy podczas różnicowania elementów sitowych;
4. Identyfikacja wzorców ewolucyjnych związanych z autofagią i składem ściany komórkowej, które mogły mieć wpływ na wykształcenie i funkcjonalność tkanek przewodzących u roślin.

Omówienie wyników

Wszystkie analizy przebiegu procesy floemogenezy były prowadzone w oparciu o materiał roślinny, wyselekcjonowany na bazie badań wstępnych i uprawiany w fitotronie lub tunelu foliowym. W zależności od realizowanych zadań badawczych, posłużono się różnymi gatunkami roślin, dobranymi odpowiednio do weryfikacji przyjętych w pracy założeń. Głównym materiałem badawczym były korzenie pionierskie topoli kalifornijskiej (*Populus trichocarpa* Torr. et A. Gray ex Hook.). Spośród roślin drzewiastych gatunek ten stanowi doskonały model badawczy, ze względu na szybki przyrost biomasy oraz dostępność danych genomowych i transkryptomicznych. Rośliny uprawiano w systemie ryzotronów, który najlepiej zapewnia warunki zbliżone do warunków naturalnych przy zachowaniu wyrównanych wzrostu i rozwoju materiału. Ryzotrony umożliwiają ciągłe obserwacje i pomiary korzeni podczas ich wzrostu, bez konieczności zbioru całej rośliny. Topola kalifornijska jako gatunek roślin drzewiastych jest organizmem modelowym, który cechuje się obecnością korzeni pionierskich o dużej średnicy, umożliwiających osiową obserwację powstających komórek drewna i łyka. Tkanki te w korzeniach o budowie pierwotnej, różnicując się we właściwym układzie czasoprzestrzennym i tworząc ciągłe pasma komórek przewodzących, umożliwiają ich precyzyjną identyfikację. W celu weryfikacji głównej hipotezy badawczej scharakteryzowano etapy rozwoju elementów sitowych zarówno na poziomie tkankowym, jak i komórkowym. Aby skorelować te etapy z obserwacjami ultrastrukturalnymi zastosowano podejście wielometodyczne, w tym analizy anatomiczne, histochemiczne i molekularne. W celu zweryfikowania uniwersalizmu występowania badanych procesów uzyskane wyniki poddano analizom porównawczym u roślin z różnych linii ewolucyjnych. Wykorzystano korzenie przedstawicieli wybranych grup systematycznych roślin naczyniowych: paproci *Ceratopteris richardii* Brongn., rośliny nagozalążkowej *Picea sitchensis* (Bong.) Carrière, jednoliściennej *Zea mays* L., dwuliściennej jednorocznej *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. i wieloletniej *Populus trichocarpa*.

Pierwszym etapem badań pracy doktorskiej było wyselekcjonowanie kolejnych stadiów różnicowania komórek przewodzących floemu (Manuskrypt nr 1, Ryc. 1). Analizy anatomiczne (Manuskrypt nr 1, Ryc. 2A, E, I) oraz lokalizacja składnika ściany komórki specyficznego dla elementów sitowych (Manuskrypt nr 1, Ryc. 2B, F, J; Ryc. S2) umożliwiły wytypowanie trzech głównych etapów floemogenezy. Na podstawie obserwacji ultrastrukturalnych scharakteryzowano typy komórek floemu w korzeniach *P. trichocarpa*. Elementy sitowe wypełnione były jednorodną cytoplazmą, jedynie w pobliżu ściany komórkowej obserwowano

nieliczne mitochondria, plastydy, retikulum endoplazmatyczne, aparat Golgiego i liczne pęcherzyki. Na przekroju poprzecznym kształt rurek sitowych metafloemu był regularny, przeważnie pięciokątny (Manuskrypt nr 1, Ryc. S6A), w przeciwieństwie do węższych, rurek protofloemu (Manuskrypt nr 1, Ryc. S6B). Komórki miękiszu floemowego były okrągłe w przekroju, z cienką ścianą komórkową i dużą centralną wakuolą (Manuskrypt nr 1, Ryc. S6C). Komórki towarzyszące były wyraźnie mniejsze i wyróżniały się gęstą cytoplazmą (Manuskrypt nr 1, Ryc. S6D). Przeprowadzone obserwacje ultrastrukturalne ujawniły specyficzne zmiany składu cytoplazmy w elementach sitowych na każdym etapie rozwoju floemu (Manuskrypt nr 1, Ryc. 2C, D, G, H, K, L). Na podstawie powyższych wyników w obrębie korzeni pionierskich *P. trichocarpa*, wyodrębniono fragmenty mające odpowiadać poszczególnym stadiom floemogenezy: 1) komórki macierzyste elementów sitowych, 2) rozwijające się elementy sitowe i 3) dojrzałe elementy sitowe (Manuskrypt nr 1, Ryc. 1). Dla wybranych fragmentów korzeni z odpowiadającymi im etapami różnicowania floemu wykonano następnie analizy molekularne. Na podstawie danych dostępnych dla *Arabidopsis thaliana*, zidentyfikowano potencjalne ortologi genów kodujących markery molekularne floemu dla *P. trichocarpa*. Wykazano wyraźny wzrost ekspresji tych genów w kolejnych stadiach floemogenezy względem tkanki merystematycznej (Manuskrypt nr 1, Tabela S1, Ryc. 2M), co pozwoliło na potwierdzenie słuszności założeń podczas typowania kolejnych fragmentów, odpowiadających określonym stadiom różnicowania elementów sitowych.

Po szczegółowym zidentyfikowaniu elementów sitowych i etapów ich różnicowania, przeprowadzono badania mające na celu potwierdzenie występowania autofagii i innych procesów degradacyjnych podczas floemogenezy. Poszukiwano markerów cytologicznych i molekularnych charakterystycznych dla zależnej od autofagii redukcji cytoplazmy. Na zaangażowanie autofagii w rozwój elementów sitowych wskazuje obecność licznych struktur specyficznych dla wszystkich stadiów makroautofagii (Manuskrypt nr 1, Ryc. 3A-D). Molekularny marker tego procesu, czyli białko ATG8, zlokalizowano w różnicującym się łyku (Manuskrypt nr 1, Ryc. 3E-F, Ryc. S3) oraz na poziomie subkomórkowym w błonach autofagosomów występujących w elementach sitowych (Manuskrypt nr 1, Ryc. 3G-I, Ryc. S4). Poziom ekspresji większości genów kodujących białka ATG8 wzrastał w korzeniach w drugim lub trzecim stadium floemogenezy (Manuskrypt nr 1, Ryc. 3J). Małe wakuole lityczne były również obecne w rozwijających się elementach sitowych (Manuskrypt nr 1, Ryc. 3K). Oprócz makroautofagii zaobserwowano mikroautofagię, prowadzącą do usuwania mniejszych fragmentów cytoplazmy lub pęcherzyków (Manuskrypt nr 1, Ryc. 3L-M). Odnotowano także spowodowany pękaniem tonoplastu rozpad wakuoli oraz uwolnienie treści wakuoli do

cytoplazmy (Manuskrypt nr 1, Ryc. 3M). Wszystkie wymienione mechanizmy są zaangażowane w redukcję składu cytoplazmy, ale nie prowadzą do śmierci komórki. Prawdopodobnie enzymy hydrolityczne uwolnione z wakuoli nie wykazywały tak silnych właściwości litycznych lub były dezaktywowane, aby nie doszło do całkowitej degradacji całego protoplastu. Natomiast degradacja poszczególnych elementów cytoplazmy, przy zachowaniu części protoplastu dowodzi, że jest to autofagia selektywna. Otrzymane wyniki sugerują, że poza autofagią także i inne procesy degradacyjne mogą mieć charakter selektywny. W literaturze przedmiotu brakuje szczegółowych informacji na ten temat, dlatego przygotowano pracę przeglądową skupiającą różne procesy eliminacji struktur komórkowych oraz scharakteryzowano cechy specyficzne dla każdego z nich. Osadzono w literaturze przedmiotu i zinterpretowano zróżnicowanie mechanizmów degradacji poszczególnych struktur, w tym mechanizmy zależne od autofagii. Organelle lub ich fragmenty mogą być usuwane przez autofagosomy, ale także samoistnie rozpadać się przez fragmentację lub stopniową redukcję zawartości (Manuskrypt nr 2). Wiele z tych procesów zaobserwowano podczas różnicowania elementów sitowych oraz potwierdzono przez analizy RT-qPCR w korzeniach pionierskich *P. trichocarpa*. W komórkach przewodzących floemu udokumentowano plastydy, które zmieniały kształt i rozwijały się wokół fragmentu cytoplazmy, włączając go do swojego wnętrza. Są to plastydy autofagowe, czyli plastolisomy (Manuskrypt nr 1, Ryc. 4A-C; Manuskrypt nr 2, Ryc. 1H), które degradują przekształcając się w ciała wielobłonowe. Degradacja plastydów i nagromadzenie ciał wielobłonowych są związane z aktywnością CHMP1B (Manuskrypt nr 1, Ryc. 4R), a geny kodujące to białko wykazały wzrost poziomu ekspresji w badanych stadiach floemogenezy. Wzrost poziomu ekspresji odnotowano także dla genów kodujących receptory autofagii plastydów, czyli AT11/AT12 oraz PUB4 (Manuskrypt nr 1, Ryc. 4R), które są jednocześnie markerami autofagii selektywnej. Mitochondria natomiast obserwowano zarówno w plastolisomach, jak i w autofagosomach oraz wakuoli (Manuskrypt nr 1, Ryc. 4C-E; Manuskrypt nr 2, Ryc. 2A). Analogicznie ekspresja markera mitofagii *ATG11* wzrastała w kolejnych stadiach różnicowania łyka (Manuskrypt nr 1, Ryc. 4R). Ponadto, zawartość niektórych mitochondriów ulegała degeneracji przy jednoczesnej proliferacji błony zewnętrznej, co prowadziło do nagromadzenia pęcherzyków pochodzenia mitochondrialnego (Manuskrypt nr 1, Ryc. 4D; Manuskrypt nr 2, Ryc. 2D). Wzrost poziomu ekspresji genu *BCS1* (Manuskrypt nr 1, Ryc. 4R) również świadczy o zmniejszeniu aktywności mitochondriów. W elementach sitowych dochodziło również do eliminacji nadmiaru błon przez powstawanie ciał wielobłonowych (Manuskrypt nr 1, Ryc. 4G-I; Manuskrypt nr 2, Ryc. 1H, Ryc. 3F). Diktiosomy aparatu Golgiego rozpadały się przez

wzmoczoną produkcję pęcherzyków (Manuskrypt nr 1, Ryc. 4J; Manuskrypt nr 2, Ryc. 4D), a niektóre z nich tworzyły pęcherzyki o kilku błonach, tak jak w przypadku autofagosomu (Manuskrypt nr 1, Ryc. 4K; Manuskrypt 2, Ryc. 4G). Aktywność autofagii oraz rozpad aparatu Golgiego związane są z występowaniem ciał wielopęcherzykowych, które również obserwowano (Manuskrypt nr 1, Ryc. 4L). Zbędne błony retikulum endoplazmatycznego ulegały fragmentacji i usuwane były do wakuoli (Manuskrypt nr 1, Ryc. 4M-N, Manuskrypt nr 2, Ryc. 3A-C). Dla genu kodującego receptor retikulofagii IRE1B również odnotowano zwiększony poziom ekspresji w kolejnych stadiach floemogenezy (Manuskrypt nr 1, Ryc. 4R). Jednak część błon retikulum endoplazmatycznego pozostawała tworząc niejako system oddzielający organelle od światła komórki, będącego miejscem przepływu substancji (Manuskrypt nr 1, Ryc. 4O-Q). Obserwowane przekształcenia mogły być wynikiem spadku gęstości elektronowej cytoplazmy wynikającej z usuwania mniejszych struktur, takich jak rybosomy oraz degradacji białek zachodzących podczas dojrzewania elementów sitowych. Geny kodujące białko RPN10, które jest markerem rybofagii, ulegały zwiększonej ekspresji podczas różnicowania łyka. Podobnie wzrost ekspresji odnotowano dla genu kodującego NBR1 – markera proteinozom (Manuskrypt nr 1, Ryc. 4R). Zwiększającą ekspresję udokumentowano również dla genu kodującego SAG20 – markera procesu starzenia. Jednak gen kodujący ACD1 – marker autofagicznej PCD wykazał niewielki wzrost ekspresji w ostatnim stadium floemogenezy.

Procesy degradacji elementów cytoplazmy bez zachodzącej jednocześnie śmierci komórki są charakterystyczne dla różnicowania komórek przewodzących floemu. Na poziomie molekularnym udowodniono również występowanie autofagii selektywnej i innych procesów degradacyjnych, potwierdzając genetyczną regulację redukcji składu cytoplazmy. Głównym procesem degradacyjnym specyficznym dla elementów sitowych jest enukleacja, czyli degradacja jądra. Analizy molekularne potwierdziły obserwowane liczne zmiany w gęstości zawartości jądra wraz z rozproszeniem otoczki jądrowej (Publikacja 1, Ryc. 5A-D) oraz jego późniejszą całkowitą degradację (Manuskrypt nr 1, Ryc. 5E; Manuskrypt nr 2, Ryc. 5C). Na poszczególnych etapach floemogenezy odnotowano wzrost ekspresji genów związanych z enukleacją komórek przewodzących floemu (Manuskrypt nr 1 Ryc. 5F). Dodatkowo, w jądrach komórkowych różnicujących się elementów sitowych uzyskano pozytywny wynik reakcji *TUNEL*, która umożliwiła identyfikację fragmentacji DNA charakterystycznej dla PCD (Manuskrypt nr 1, Ryc. S5).

Wykształcenie na drodze ewolucji floemu, tak jak i ksylemu, umożliwiło roślinom efektywny transport substancji i przystosowanie do różnych środowisk. Liczne badania

udowodniły, że autofagia jest zaangażowana w PCD podczas rozwoju elementów trachealnych, a wyniki tej pracy potwierdziły kluczową funkcję autofagii w rozwoju elementów sitowych, które pozostają żywe. Poza redukcją cytoplazmy ważnym procesem w rozwoju ksylemu i floemu jest formowanie ściany komórkowej. Nie wiadomo jednak, czy mechanizmy potwierdzone na roślinach modelowych są uniwersalne i charakterystyczne dla wszystkich roślin. Zatem kolejnym zadaniem badawczym pracy doktorskiej było sprawdzenie, czy istnieje ewolucyjny wzorzec dla roli autofagii (Publikacja nr 3, Ryc. 1) i składu ściany komórkowej (Publikacja nr 3, Ryc. 2) w tkankach przewodzących oddalonych ewolucyjnie gatunków.

Autofagia jest zaangażowana w różnicowanie komórek przewodzących ksylemu, która kończy się śmiercią komórki oraz floemu z selektywną degradacją cytoplazmy. W obu tkankach podczas różnicowania obserwowano białko ATG8 (Manuskrypt nr 1, Ryc. 3E-F). Nie wiadomo jaki mechanizm molekularny odpowiada za różną funkcję tego białka w obu tkankach. Nieznane są również funkcje poszczególnych izoform białka ATG8. Ich różnorodność, w tym uruchamianie i poziom ekspresji, może mieć wpływ na procesy całkowitej lub częściowej degradacji w tkankach przewodzących roślin naczyniowych. Możliwe, że różne izoformy ATG8 charakteryzują się różną specyficznością do etapu rozwoju, tkanki lub organu. W korzeniach wszystkich badanych roślin (Publikacja nr 3, Tabela S1) zlokalizowano białko ATG8 w rozwijających się komórkach przewodzących ksylemu i floemu (Publikacja nr 3, Ryc. 3). Po wykonaniu analiz bioinformatycznych zidentyfikowano trzy sekwencje kodujące ATG8 dla paproci *C. richardii*. Podczas ewolucji roślin liczba izoform tego białka ulegała zmianom. Obserwowano przeważnie jej wzrost, dla przykładu 3 u *Ceratopteris richardii*, a 14 izoform u *P. trichocarpa* (Publikacja 3, Tabela S1). Sama ewolucja genów *ATG8* była związana z ich powieleniem, bez znaczących zmian w ich sekwencji, co wskazuje, że są one silnie konserwatywne. Poziom podobieństwa cdsSeq *ATG8* badanych gatunków jest bardzo wysoki (Publikacja nr 3, Tabela S2, Ryc. S1), nawet jeśli należą do różnych kładów (Publikacja nr 3, Ryc. S2). Konserwatywny charakter autofagii, rosnąca liczba izoform *ATG8* i adaptacja tkanek roślinnych do transportu substancji wskazują na potencjalny wpływ autofagii na rozwój w toku ewolucji komórek przewodzących o silnie zróżnicowanym składzie cytoplazmy. Nie wykazano jednak takiej zależności w formowaniu ściany komórkowej. Wyniki badań wykazały, że skład ściany komórkowej znacznie różnił się w ksylemie i floemie oraz w zależności od analizowanego gatunku roślin (Publikacja nr 3, Ryc. 4 i Ryc. 5, Tabela 1). Analizy porównawcze dostarczyły niewystarczających lub sprzecznych wyników dotyczących ewolucyjnych podstaw tworzenia i zmienności składu ściany komórkowej. Występowanie poszczególnych składników ściany komórkowej nie jest uniwersalne. Jedynie białka

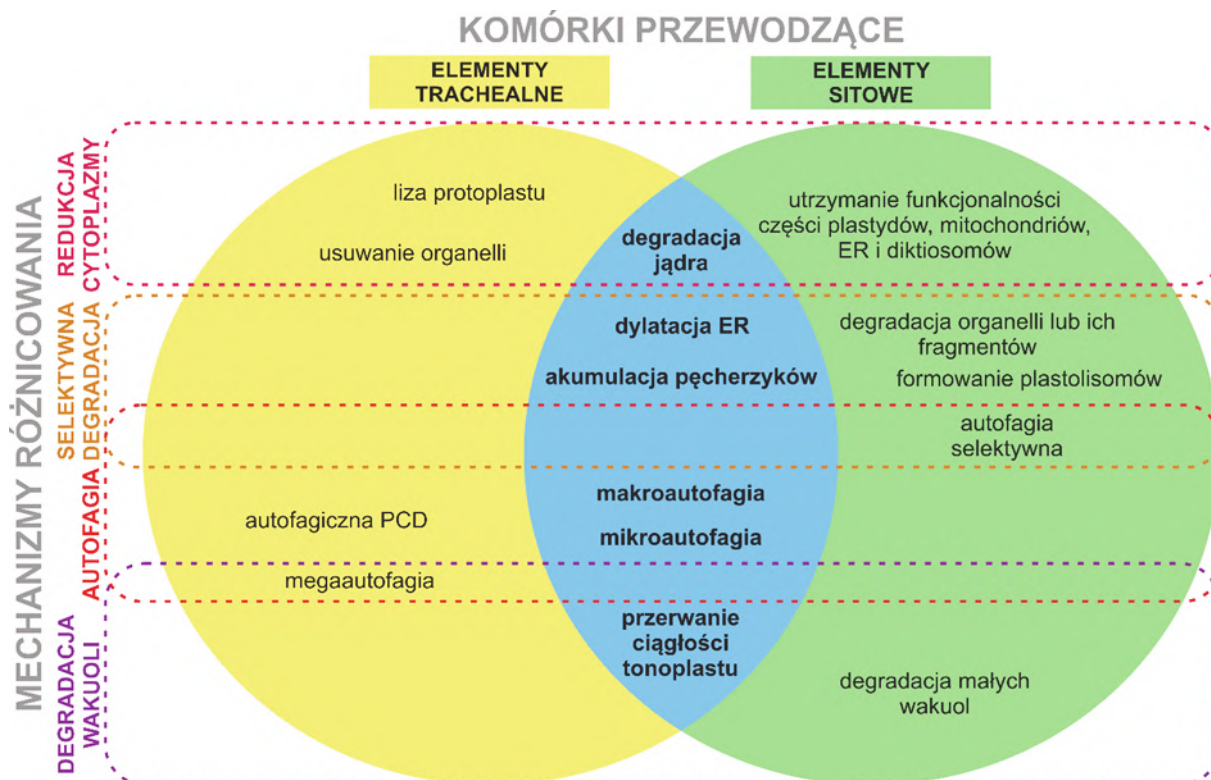
arabinogalaktanu (AGP – ang. *ArabinoGalactan Proteins*) i β -1,4-galaktanu zlokalizowano w korzeniach wszystkich badanych gatunków, wskazując na ich potencjalne znaczenie w różnicowaniu i późniejszym funkcjonowaniu floemu. Nie ma co prawda dostępnych danych na temat roli AGP w elementach sitowych, wiadomo jednak, że białka te odgrywają rolę podczas rozwoju elementów trachealnych, nie tylko w modyfikacji ściany komórkowej, ale także w aktywacji mechanizmów PCD. Możliwe, że AGP mają również wpływ na procesy degradacyjne zachodzące w komórkach przewodzących floemu. Z kolei β -1,4-galaktan jest składnikiem ściany komórkowej, który zwiększa zarówno jej twardość oraz wytrzymałość, jak i elastyczność. Wydaje się to niezwykle ważne, ponieważ rurka sitowa jest dostosowana do napięć indukowanych przez zmiany turgoru. Nie zaobserwowano żadnego ewolucyjnego wzorca dla ksyloglukanu, arabinanu ani homogalakturonanu. Występowanie tych składników nie było powtarzalne ani pod względem rodzaju tkanki, ani gatunku rośliny (Publikacja nr 3, Ryc. 4 i Ryc. 5, Tabela 1). Wydaje się zatem, że rolę tych składników należy odnosić do funkcji tkanki i organu, genotypu taksonu lub środowiska wzrostu, nie natomiast do przystosowania ewolucyjnego.

Wnioski i podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych badań wysunięto następujące wnioski:

1. Objawy inicjacji poszczególnych etapów floemogenezy są wysoce specyficzne i przebiegają w ściśle określonym porządku czasoprzestrzennym;
2. Różnicowanie elementów sitowych jest kontrolowane przez geny związane z autofagią, których ekspresja determinuje makroautofagię i prawidłowy przebieg floemogenezy;
3. Usuwanie elementów protoplastu w różnicujących się elementach sitowych zachodzi na drodze selektywnej degradacji, angażującej mikroautofagię i makroautofagię, ale także formowanie plastolisomów i ciał wielobłonowych, samoistną degradację organelli oraz rozpad małych wakuol litycznych;
4. Autofagia to proces specyficzny dla różnicowania tkanek przewodzących u roślin. Dla modyfikacji ściany komórkowej nie stwierdzono jednak specyficznego wzorca ewolucji w tkankach przewodzących. W przeciwieństwie do konserwatywnej autofagii, zmienność ściany komórkowej w toku ewolucji następowała prawdopodobnie wieloszlakowo, z różnymi mechanizmami następczymi.

Najważniejszym osiągnięciem niniejszej rozprawy doktorskiej było pogłębienie wiedzy o różnicowaniu elementów sitowych jako żywych komórek o bardzo ograniczonej zawartości, których organelle podlegają selektywnym procesom degradacyjnym. Dotychczas rozwój floemu był stosunkowo słabo poznany, mimo fundamentalnej roli tej tkanki w funkcjonowaniu roślin. Wieloaspektowe podejście z wykorzystaniem nowoczesnych metod badawczych umożliwiło zobrazowanie przebiegu floemogenezy, wyznaczając wiele perspektyw w biologii rozwojowej oraz molekularnej. Uzyskane wyniki znacząco poszerzyły dotychczasową wiedzę na temat nie tylko autofagii selektywnej, ale również innych działających selektywnie procesów degradacyjnych zachodzących w komórkach roślinnych. Porównanie przebiegu floemogenezy z programowaną śmiercią komórki zachodzącą podczas ksylogenezy, umożliwiło lepsze zrozumienie działania procesów z jednej strony degradacyjnych, a z drugiej jednak o całkowicie odmiennym skutku (Ryc. 3).



Ryc. 3. Mechanizmy degradacyjne zaangażowane w różnicowanie komórek przewodzących ksylemu – elementów trachealnych oraz komórek przewodzących floemu – elementów sitowych; ER – retikulum endoplazmatyczne, PCD – programowana śmierć komórki.

Przeprowadzone badania mają również wkład w zrozumienie rozwoju tkanek przewodzących w aspekcie ewolucyjnym. Funkcjonalna zależność pomiędzy rozwojem elementów przewodzących ksylemu oraz floemu a wzrostem i stabilnością roślin ma fundamentalne znaczenie dla ich produktywności. Wykazano, że elementy sitowe stanowią bardzo dobry model badawczy, który może zostać wykorzystany do poznania funkcjonowania komórki, która mimo intensywnych zmian i utraty organelli pozostaje żywa. Określenie charakteru procesów koordynujących zatrzymanie obumierania komórki w „połowie drogi” jest niezwykle interesującym zagadnieniem o dużym potencjale poznawczym, które otwiera nowe perspektywy badawcze. Z pewnością obserwacje morfodynamiki organelli w komórkach przewodzących floemu *in vivo* pozwolą poznać sekwencję etapów prowadzących do ich degeneracji. Wizualizacja 3D tych procesów umożliwi z kolei szczegółową analizę przemian struktury organelli na każdym z etapów ich przemian. Regulacja i sam przebieg wewnątrzkomórkowych procesów degradacyjnych na poziomie molekularnym wymagają wciąż analizy u większości organizmów. Niewiele wiadomo również o mechanizmach przeciwnych, utrzymujących komórkę przy życiu. W erze badań transkryptomu metodą

„single cell” niezbędne staje się paralelne analizowanie danych molekularnych do mechanizmów na poziomie subkomórkowym, co jest także możliwe z wykorzystaniem lokalizacji białek metodą immunocytochemiczną. Po zastosowaniu nowoczesnych technologii, wykorzystując tak interesujący model badawczy jakim są elementy sitowe, działanie wielu procesów może zostać na nowo zdefiniowane.

Bibliografia

- Bagniewska-Zadworna A., Arasimowicz-Jelonek M., Smolinski D. J., Stelmasik A. 2014.** New insights into pioneer root xylem development: evidence obtained from *Populus trichocarpa* plants grown under field conditions. *Annals of Botany*, **113**: 1235-1247.
- Bagniewska-Zadworna A., Byczyk J., Eissenstat D. M., Oleksyn J., Zadworny M. 2012.** Avoiding transport bottlenecks in an expanding root system: xylem vessel development in fibrous and pioneer roots under field conditions. *American Journal of Botany*, **99**: 1417-1426.
- Evert R. F. 1977.** Phloem structure and histochemistry. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **28**: 199-222.
- Evert R. F. 2006a.** Phloem: cell types and developmental aspects. *Esau's plant anatomy: Meristems, cells and tissues of the plant body: their structure, function and development*. 3rd ed. Hoboken (USA): John Wiley & Sons, Interscience.
- Evert R. F. 2006b.** Xylem: cell types and developmental aspects. *Esau's plant anatomy: Meristems, cells and tissues of the plant body: their structure, function and development*. 3rd ed. Hoboken (USA): John Wiley & Sons, Interscience.
- Fukuda H. 2004.** Signals that control plant vascular cell differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **5**: 379-391.
- Furuta K. M., Yadav S. R., Lehesranta S., Belevich I., Miyashima S., Heo J. O., Vaten A., Lindgren O., De Rybel B., Van Isterdael G., Somervuo P., Lichtenberger R., Rocha R., Thitamadee S., Tahtiharju S., Auvinen P., Beeckman T., Jokitalo E., Helariutta Y. 2014.** Plant development. Arabidopsis NAC45/86 direct sieve element morphogenesis culminating in enucleation. *Science*, **345**: 933-937.
- Kuriyama H., Fukuda H. 2002.** Developmental programmed cell death in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**: 568-573.
- Lucas W. J., Groover A., Lichtenberger R., Furuta K., Yadav S. R., Helariutta Y., He X. Q., Fukuda H., Kang J., Brady S. M., Patrick J. W., Sperry J., Yoshida A., Lopez-Millan A. F., Grusak M. A., Kachroo P. 2013.** The plant vascular system: evolution, development and functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, **55**: 294-388.
- Mellerowicz E. J., Sundberg B. 2008.** Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics and their implications for wood properties. *Current Opinion in Plant Biology*, **11**: 293-300.

- Mullendore D. L., Windt C. W., Van As H., Knoblauch M. 2010.** Sieve tube geometry in relation to phloem flow. *Plant Cell*, **22**: 579-593.
- Niklas K. J. 2016.** *Plant evolution. An introduction to the history of life.* Chicago and London: The University of Chicago Press.
- Ohtani M., Akiyoshi N., Takenaka Y., Sano R., Demura T. 2017.** Evolution of plant conducting cells: perspectives from key regulators of vascular cell differentiation. *Journal of Experimental Botany*, **68**: 17-26.
- Scarpella E., Meijer A. H. 2004.** Pattern formation in the vascular system of monocot and dicot plant species. *New Phytologist*, **164**: 209-242.
- van Bel A. J. E. 2003.** The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell & Environment*, **26**: 125-149.
- van Doorn W. G., Beers E. P., Dangl J. L., Franklin-Tong V. E., Gallois P., Hara-Nishimura I., Jones A. M., Kawai-Yamada M., Lam E., Mundy J., Mur L. A., Petersen M., Smertenko A., Taliansky M., Van Breusegem F., Wolpert T., Woltering E., Zhivotovsky B., Bozhkov P. V. 2011.** Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death & Differentiation*, **18**: 1241-6.
- van Doorn W. G., Woltering E. J. 2010.** What about the role of autophagy in PCD? *Trends in Plant Science*, **15**: 361-362.
- Van Durme M., Nowack M. K. 2016.** Mechanisms of developmentally controlled cell death in plants. *Current Opinions in Plant Biology*, **29**: 29-37.
- Venturas M. D., Sperry J. S., Hacke U. G. 2017.** Plant xylem hydraulics: What we understand, current research, and future challenges. *Journal of Integrative Plant Biology*, **59**: 356-389.
- Wang L., Zhou Z., Song X., Li J., Deng X., Mei F. 2008.** Evidence of ceased programmed cell death in metaphloem sieve elements in the developing caryopsis of *Triticum aestivum* L. *Protoplasma*, **234**: 87-96.
- Wojciechowska N., Michalak K. M., Bagniewska-Zadworna A. 2021.** Autophagy—an underestimated coordinator of construction and destruction during plant root ontogeny. *Planta*, **254**: 15.
- Wojciechowska N., Smugarzewska I., Marzec-Schmidt K., Zarzynska-Nowak A., Bagniewska-Zadworna A. 2019.** Occurrence of autophagy during pioneer root and stem development in *Populus trichocarpa*. *Planta*, **250**: 1789-1801.

- Yang W., Cai J., Zhou Z., Zhou G., Mei F., Wang L. 2015.** Microautophagy involves programmed cell semi-death of sieve elements in developing caryopsis of *Triticum aestivum* L. *Cell Biology International*, **39**: 1364-1375.
- Ye Z. H. 2002.** Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants. *Annual Review in Plant Biology*, **53**: 183-202.

Manuskrypt nr 1 wraz z oświadczeniami

Michalak K. M., Wojciechowska N., Kułak K., Minicka J., Jagodziński A. M., Bagniewska-Zadworna A. *Is autophagy always a death sentence? A case study of highly selective cytoplasmic degradation during phloemogenesis* (w recenzji)

[Michalak et al. 2024a preprint](#)

Poznań, 26 lipca, 2024 r.

Kornel Michalak
Zakład Botaniki Ogólnej
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

OŚWIADCZENIE

W związku z zamiarem włączenia manuskryptu:

Michalak K. M., Wojciechowska N., Kułak K., Minicka J., Jagodziński A. M., Bagniewska-Zadworna A. **Is autophagy always a death sentence? A case study of highly selective cytoplasmic degradation during phloemogenesis**

do mojej rozprawy doktorskiej, oświadczam, że mój wkład obejmował:

- uczestnictwo w opracowaniu koncepcji i planu badań;
- uprawę roślin i zbiór materiału;
- analizy anatomiczne;
- analizy ultrastrukturalne;
- wykonanie preparatów do analiz immunochemicznych;
- wykonanie reakcji immunocytochemicznych;
- izolacja RNA i wyselekcjonowanie genów do analiz molekularnych;
- interpretacja wyników i sporządzenie rycin graficznych;
- przygotowanie manuskryptu.

Michalak

Abagmiesius - Ledrosme

promotor

Natalia Wojciechowska

promotor pomocniczy

Poznań, 26 lipca, 2024 r.

dr Natalia Wojciechowska
Zakład Botaniki Ogólnej
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

OŚWIADCZENIE

W związku z zamiarem włączenia przez Kornela Michalaka manuskryptu:

Michalak K. M., Wojciechowska N., Kułak K., Minicka J., Jagodziński A. M., Bagniewska-Zadworna A. **Is autophagy always a death sentence? A case study of highly selective cytoplasmic degradation during phloemogenesis**

do Jego rozprawy doktorskiej, oświadczam, że mój wkład obejmował:

- wykonanie reakcji immunohistochemicznych (ATG8, LM26);
- przeprowadzenie analizy ekspresji genów ATG8 wraz z analizą statystyczną uzyskanych wyników;
- analizę danych i interpretację otrzymanych wyników;
- udział w przygotowaniu manuskryptu.

Natalia Wojciechowska

Poznań, 13 sierpnia 2024 r.

dr Karolina Kułak
Zakład Botaniki Ogólnej
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

OŚWIADCZENIE

W związku z zamiarem włączenia przez Kornela Michalaka manuskryptu:

Michalak K. M., Wojciechowska N., Kułak K., Minicka J., Jagodziński A. M., Bagniewska-Zadworna A. **Is autophagy always a death sentence? A case study of highly selective cytoplasmic degradation during phloemogenesis**

do Jego rozprawy doktorskiej, oświadczam, że mój udział obejmował:

- identyfikację w genomie *P. trichocarpa* potencjalnych ortologów genów zidentyfikowanych wcześniej w *A. thaliana*, związanych z procesem autofagii
- analizę filogenetyczną białek ATG8
- analizę ekspresji genów z użyciem techniki RT-qPCR
- przygotowanie figur przedstawiających ekspresję zidentyfikowanych genów
- redakcję części manuskryptu, związanej z wykonanymi analizami.



Poznań, 26 sierpnia, 2024 r.

dr Julia Minicka
Zakład Wirusologii i Bakteriologii
Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Władysława Węgorka 20
60-318 Poznań

OŚWIADCZENIE

W związku z zamiarem włączenia przez Kornela Michalaka manuskryptu:

Michalak K. M., Wojciechowska N., Kułak K., Minicka J., Jagodziński A. M.,
Bagniewska-Zadworna A. **Is autophagy always a death sentence? A case study of
highly selective cytoplasmic degradation during phloemogenesis**

do Jego rozprawy doktorskiej, oświadczam, że mój udział obejmował: przygotowanie próbek do analiz w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (krojenie materiału, przygotowanie siatek i barwienie skrawków).

J. Minicka

Kórnik, 4 września 2024 r.

prof. dr hab. inż. Andrzej M. Jagodziński
Instytut Dendrologii Polskiej Akademii Nauk
ul. Parkowa 5
62-035 Kórnik

OŚWIADCZENIE

W związku z zamiarem włączenia przez Pana Kornela Michalaka manuskryptu:

Michalak K.M., Wojciechowska N., Kułak K., Minicka J., Jagodziński A.M., Bagniewska-Zadworna A. **Is autophagy always a death sentence? A case study of highly selective cytoplasmic degradation during phloemogenesis**

do Jego rozprawy doktorskiej, oświadczam, że mój udział w powstaniu niniejszej pracy obejmował:

wniesienie uwag i uzupełnień do maszynopisu publikacji.



Signed by /
Podpisano przez:

Andrzej Mariusz
Jagodziński

Date / Data:
2024-09-04 13:01

Andrzej M. Jagodziński

[dokument podpisany elektronicznie]

Poznań, 26 sierpnia, 2024 r.

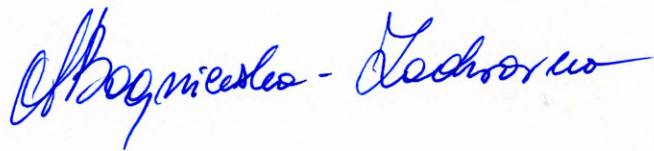
prof. UAM dr hab. Agnieszka Bagniewska-Zadworna
Zakład Botaniki Ogólnej
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

OŚWIADCZENIE

W związku z zamiarem włączenia przez Kornela Michalaka manuskryptu:

Michalak K. M., Wojciechowska N., Kułak K., Minicka J., Jagodziński A. M., Bagniewska-Zadworna A. **Is autophagy always a death sentence? A case study of highly selective cytoplasmic degradation during phloemogenesis**

do Jego rozprawy doktorskiej, oświadczam, że mój wkład polegał na kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, udziale w opracowaniu koncepcji i projektu pracy, koordynacji prac eksperymentalnych i opiece merytorycznej podczas wykonywania badań, interpretacji otrzymanych wyników oraz udziale w przygotowaniu publikacji do druku.



Manuskrypt nr 2 wraz z oświadczeniami

Michalak K. M., Bagniewska-Zadworna A. *Exploring specific degradation processes of plant cell components. Vascular tissues reveal that there is more than selective autophagy*
(przygotowane do wysłania)

[Michalak et al. 2024b preprint](#)

Poznań, 26 lipca, 2024 r.

Kornel Michalak
Zakład Botaniki Ogólnej
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

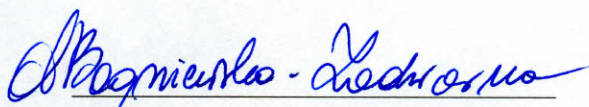
OŚWIADCZENIE

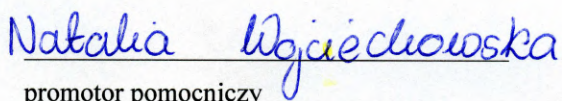
W związku z zamiarem włączenia manuskryptu:

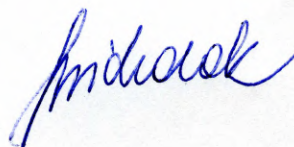
Michalak K. M., Bagniewska-Zadworna A. **Exploring specific degradation processes of plant cell components. Vascular tissues reveal that there is more than selective autophagy**

do mojej rozprawy doktorskiej, oświadczam, że mój udział obejmował:

- opracowanie koncepcji pracy;
- sporządzenie rycin graficznych;
- przygotowanie manuskryptu.


promotor


promotor pomocniczy



Poznań, 26 sierpnia, 2024 r.

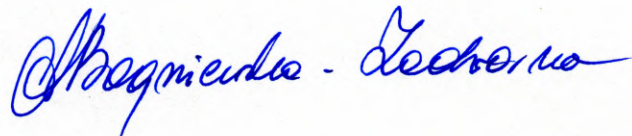
prof. UAM dr hab. Agnieszka Bagniewska-Zadworna
Zakład Botaniki Ogólnej
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

OŚWIADCZENIE

W związku z zamiarem włączenia przez Kornela Michalaka manuskryptu:

Michalak K. M., Bagniewska-Zadworna A. **Exploring specific degradation processes of plant cell components. Vascular tissues reveal that there is more than selective autophagy**

do Jego rozprawy doktorskiej, oświadczam, że mój udział obejmował: pomoc w opracowaniu koncepcji pracy, dyskusję nad prezentacją opisywanych zagadnień oraz przeczytanie, skomentowanie i edycję przygotowanego manuskryptu.



Publikacja nr 3 wraz z oświadczeniami

Michalak K. M., Wojciechowska N., Marzec-Schmidt K., Bagniewska-Zadworna A. 2024.
Conserved autophagy and diverse cell wall composition: Unifying features of vascular tissues in evolutionarily distinct plants. *Annals of Botany* 133: 559-572.

<https://academic.oup.com/aob/article-pdf/133/4/559/57311850/mcae015.pdf>

Poznań, 26 lipca, 2024 r.

Kornel Michalak
Zakład Botaniki Ogólnej
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

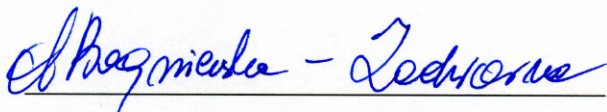
OŚWIADCZENIE

W związku z zamiarem włączenia publikacji:

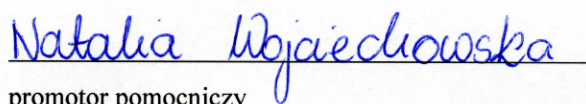
Michalak K. M., Wojciechowska N., Marzec-Schmidt K., Bagniewska-Zadworna A. (2024)
Conserved autophagy and diverse cell wall composition: unifying features of vascular tissues in evolutionarily distinct plants *Annals of Botany* 133 (4), 559-572

do mojej rozprawy doktorskiej, oświadczam, że mój wkład obejmował:

- uczestnictwo w opracowaniu koncepcji i planu badań;
- uprawę roślin i zbiór materiału;
- analizy anatomiczne;
- wykonanie preparatów do analiz mikroskopowych;
- udział w wykonaniu reakcji immunolokalizacji;
- interpretacja otrzymanych wyników oraz sporządzenie rycin graficznych i tabel;
- przygotowanie manuskryptu publikacji.



promotor



promotor pomocniczy



Poznań, 26 lipca, 2024 r.

dr Natalia Wojciechowska
Zakład Botaniki Ogólnej
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

OŚWIADCZENIE

W związku z zamiarem włączenia przez Kornela Michalaka publikacji:

Michalak K. M., Wojciechowska N., Marzec-Schmidt K., Bagniewska-Zadworna A. (2024)
Conserved autophagy and diverse cell wall composition: unifying features of vascular tissues in evolutionarily distinct plants *Annals of Botany* 133 (4), 559-572

do Jego rozprawy doktorskiej, oświadczam, że mój wkład obejmował:

- udział w przeprowadzeniu reakcji immunohistochemicznych,
- uczestnictwo w analizie danych i interpretacji wyników;
- udział w przygotowaniu manuskryptu.

Natalia Wojciechowska

Bjuv (Szwecja), 3 lipca, 2024 r.

dr inż. Katarzyna Marzec-Schmidt
Nomad Foods Ltd.
Findus Sverige AB,
Bjuv, Sweden

OŚWIADCZENIE

W związku z zamiarem włączenia przez Kornela Michalaka publikacji:

Michalak K. M., Wojciechowska N., Marzec-Schmidt K., Bagniewska-Zadworna A.
(2024) **Conserved autophagy and diverse cell wall composition: unifying features of vascular tissues in evolutionarily distinct plants** *Annals of Botany* 133 (4), 559-572

do Jego rozprawy doktorskiej, oświadczam, że mój wkład obejmował:

- analizy bioinformatyczne i opis wyników;
- redakcję manuskryptu.

Katarzyna Marzec-Schmidt

Poznań, 26 sierpnia, 2024 r.

prof. UAM dr hab. Agnieszka Bagniewska-Zadworna
Zakład Botaniki Ogólnej
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

OŚWIADCZENIE

W związku z zamiarem włączenia przez Kornela Michalaka publikacji:

Michalak K. M., Wojciechowska N., Marzec-Schmidt K., Bagniewska-Zadworna A. (2024)
Conserved autophagy and diverse cell wall composition: unifying features of vascular tissues in evolutionarily distinct plants *Annals of Botany* 133 (4), 559-572

do Jego rozprawy doktorskiej, oświadczam, że mój wkład w powstanie tej pracy polegał na kierowaniu projektem naukowym obejmującym badania opisane w tej pracy, udziale w opracowaniu koncepcji pracy, koordynacji prac eksperymentalnych i opiece merytorycznej podczas wykonywania badań, interpretacji otrzymanych wyników oraz udziale w przygotowaniu publikacji do druku.

