

INDUKCJA I UTRZYMANIE POLARNOŚCI W TKANKACH *ZINNIA ELEGANS* L. W KULTURACH *IN VITRO*

Induction and maintainance of the polarity in tissues of *Zinnia elegans* L. cultured *in vitro*

Aleksandra RUSIN¹, Paweł KOJS¹, Wiesław WŁOCH^{1,2}

¹Pracownia Zachowania Bioróżnorodności Górnego Śląska Ogrodu Botanicznego CZRB PAN,
ul. Żorska 2, 47-400 Racibórz

²Uniwersytet Śląski, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice

STRESZCZENIE

Układ elementów trachealnych i wydłużonych komórek parenchymatycznych wskazuje na pewne aspekty polarności tkanek. W niektórych regionach parenchymy rdzeniowej umieszczonej pomiędzy źródłem a ujściem auksyny pierwotna polarność zostaje zachowana w kulturach *in vitro* i przejawia się powstawaniem długich naczyń z dobrze wykształconymi cechami osiowymi. Parenchyma rdzeniowa poddana działaniu egzogennej auksyny przekształca się w kalus i nie zachowuje osiowego wzoru wzrostu. W kalusie nie powstawały liniowe naczynia a jedynie naczynia kołowe lub spiralne.

WSTĘP

Wykształcenie się polarności rośliny jest integralną składową rozwoju ontogenetycznego i odzwierciedla polarność zygoty (Steinmann i wsp. 1999, Hamann 2001). We wczesnych stadiach embriogenezy organogeneza i histogeneza zachodzą równocześnie; w wyniku organogenezy zostają ukształtowane i odpowiednio względem siebie rozmieszczone merystem wierzchołkowy pędu, hipokotyl, liście, radikula i merystem wierzchołkowy korzenia, natomiast w wyniku histogenezy powstają prekursorzy tkanki okrywającej, mięsistej i naczyniowej, dające się wyróżnić dzięki szczególnym wzorom wzrostu i orientacji podziałów (Dengler 2001).

Polarność uwidacznia się na różnych poziomach organizacji ciała rośliny, zarówno na po-

ziomie organów (odmienność pędów i korzeni) jak i ultrastruktury komórek (asymetryczne rozmieszczenie organelli komórkowych, asymetryczne rozmieszczenie białek w błonie komórkowej); jej przejawy można obserwować także w zjawiskach transportu substancji. Odbiciem osi polarności rośliny na poziomie tkankowym i komórkowym jest osiowy układ tkanek przewodzących, orientacja długich osi komórek, zgrubienia wtórnej ściany elementów trachealnych prostopadłe do długiej osi komórki (i organu) oraz umiejscowienie perforacji (Gersani i Sachs 1984, Sachs 1981a, Sachs 1991, Warren-Wilson i wsp. 1991).

Auksyna, która reguluje wiele procesów od embriogenezy do starzenia (Estelle 1992) odpowiada za wykształcenie osi polarności (Chen i wsp. 2001, Benjamins i wsp. 2001, Mayer i wsp. 1993, Berleth Juergens 1993) i jej utrzymanie w dalszych etapach rozwoju. Uważa się, że za utrzymanie polarności odpowiedzialny jest polarny transport auksyny, którego podłożem jest asymetryczne rozmieszczenie białek transportujących auksynę (Estelle 1998, Muller i wsp. 1998).

Auksyna jest hormonem, który może stymulować własny transport i czynić go „bardziej polarnym” (Rayle i wsp. 1969). Ta autokatalityczna własność transportu auksyny ma bardzo poważne konsekwencje dla inicjowania polarności transportu w tkance początkowo nie wykazującej cech polarności. Przypuszcza się, że początkowo dyfuzyjny transport auksyny od źródła do ujścia dzięki samowzmocnieniu indukuje polarność w tkance (Sachs 1981b, c, War-

ren-Wilson i Warren-Wilson 1991, 1993). W organach roślinnych auksyna produkowana w wierzchołku pędu przemieszcza się dyfuzyjnie w kierunku ujścia, którym są wiązki przewodzące; wraz z przetransportowaniem pewnej porcji auksyny ustala się preferowany kierunek transportu i pojawia się polarność transportu (Sachs 1981a). Ustanowiona polarność jest utrzymywana dzięki dodatniemu sprzężeniu zwrotnemu. Ponieważ polarny transport jest szybszy i bardziej wydajny niż dyfuzja, to preferowane jest utrzymanie kierunku transportu wzdłuż ustalonej osi polarności, nawet wbrew gradientowi egzogennej auksyny (Sachs 1981c). Polarność transportu jest słabiej wyrażona i mniej trwała w parenchymie podstawowej, niż w dojrzewających elementach tkanek przewodzących i prokambium oraz kambium (Sheldrake 1973).

Postuluje się, że polarny transport auksyny w określonym kierunku przez tkankę początkowo nie transportującą auksyny polarnie może być zapoczątkowany przez dyfuzję (Mitchinson 1980, Sachs 1991, Warren-Wilson i Warren-Wilson 1993). Markerem osi polarności jest orientacja długich osi komórek i przebieg ciągów elementów trachealnych. Wielu przykładów indukcji polarności pod wpływem przepływu auksyny dostarczają prace Sachsa (na przykład 1968, 1991) nad przebiegiem wiązek przewodzących od punktowego źródła. Wiązki różnicowały się wzdłuż domniemanego kierunku przepływu auksyny od źródła (na przykład pasty lanolinowej zawierającej auksynę) do ujścia, którym były istniejące wiązki przewodzące lub korzenie.

W układach doświadczalnych stosowanych przez Warren-Wilson i Warren-Wilson oraz Sachsa indukowano ksylogenezę w tkance miękiszowej, znajdującej się w organie, a tym samym poddanej oddziaływaniom międzykomórkowym, bądź w tkance eksplantatów pierwotnych (rdzeń łodygi) z regularnym układem komórek, które mogły zachować pamięć o położeniu w roślinie i oryginalnej polarności.

Kalus nie transportuje auksyny polarnie, lecz w drodze dyfuzji zgodnie z gradientem koncentracji, co pokazano badając charakterystykę przepływu radioaktywnej auksyny podanej na kalus w blozku agarowym (Jeffs i Northcote 1967). Tkanka kalusa oprócz braku zdolności do transportowania auksyny w sposób po-

larny, charakteryzuje się brakiem preferowanego kierunku wydłużania komórek, orientacji ścian podziałowych, uporządkowania mikrotubul oraz mikrofibryli celulozy w ścianach (Warren-Wilson i Warren-Wilson 1993). Tym samym może być dobrym układem do badania, w jakim stopniu możliwe jest indukowanie polarnego transportu auksyny dzięki początkowej dyfuzji od źródła do ujścia.

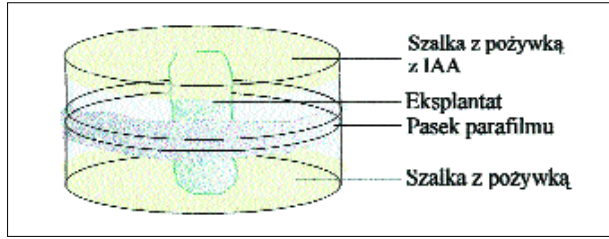
W pracy postanowiono zbadać czy w kalusie rosnącym pomiędzy źródłem i ujściem auksyny pojawiają się komórkowe przejawy osiowości wyrażone przebiegiem ciągów elementów trachealnych, rozmieszczeniem perforacji, organizacją podziałów komórkowych i wzrostu elonacyjnego.

MATERIAŁY I METODY

Nasiona *Zinnia elegans* cv. *multiflora* zakupione w firmie Coleus Poznań, po namoczeniu przez 10 h w wodzie wodociągowej wysiewano do donic z ziemią umieszczonych na regale hodowlanym pod oświetleniem lamp halogenowych OSRAM Fluora 18 W, przy fotoperiodzie 14 h światło/10 h ciemność. Rośliny podlewano wodą wodociągową. Odcinki międzywęźli będące źródłem eksplantatów pierwotnych sterylizowano przez 20 min w 3% podchlorynie sodu. Stosowano zestawy mikro-, makroelementów i witamin według Murashige, Skooga (1962). Stężenie sacharozy w pożywce wynosiło 2%. Pożywki zestalano 0,8 lub 1% agarem.

W celu izolacji rdzenia łodyg ze sterylnych odcinków trzeciego międzywęźla 10-tygodniowych roślin (o średnicy około 4 mm), odcinano tkanki korowe i przewodzące. (Ponieważ w łodygach istnieją silne naprężenia tkankowe, które powodują wyginanie wycinka jednostronnie pozbawionego tkanek zewnętrznych, konieczne było szybkie, naprzemienne odcinanie fragmentów tkanek korowych i przewodzących, raz z jednej, raz z drugiej strony łodyg). Otrzymane eksplantaty o średnicy około 1 mm umieszczano pomiędzy połówkami szalek Petriego, zawierającymi pożywkę zestaloną agarem 1% (Ryc. 1). IAA w stężeniu $1,25 \cdot 10^{-4}$ M znajdował się w pożywce podanej na koniec apikalny lub bazalny odcinków rdzenia. W wariantach kontrolnych pożywka nie zawierała auksyny.

W celu otrzymania kalusa pozbawionego elementów trachealnych na apikalny koniec od-



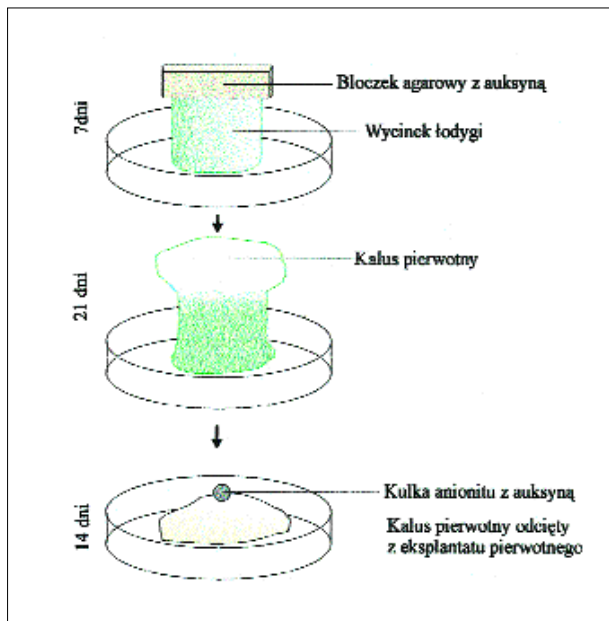
Ryc. 1. Sposób umieszczenia izolowanego rdzenia łodygi między dwiema połówkami szalek Petriego zawierającymi pożywkę zestawoną agarem

Fig. 1. The technique of culture of pith parenchyma between two halves of Petri dishes containing culture medium

cinka epikotylu podawano bloczek agarowy, zawierający 10^{-8} M auksyny, który po tygodniu usuwano (Ryc. 2). Kalus pierwotny powstały po kolejnych trzech tygodniach na apikalnym końcu eksplantatu pasażowano na nową pożywkę. Pasażowane fragmenty miały kształt półkuli o średnicy około 4 mm i wysokości około 2 mm. W celu indukcji różnicowania elementów trachealnych w kalusie na szczycie ko-

puły kalusa pierwotnego umieszczono kulki anionitu DOWEX X 100, nasączonego auksyną, które wymieniano co 24 h. Zawartość auksyny w kulce anionitu o średnicy 250 μ m wynosiła 30 pg.

Materiał utrwalono 2,5% aldehydem glutarowym w 0,7 M buforze fosforanowym o pH 6,8. Odręczne przekroje prześwietlono 80% kwasem mlekowym. Półcienkie skrawki przez materiał



Ryc. 2. Zestawienie zabiegów służących do otrzymania kalusa pozbawionego elementów trachealnych na końcu apikalnym wycinka łodygi oraz indukcji różnicowania elementów trachealnych w tkance kalusowej pasażowanej na nową pożywkę

Fig. 2. The technique of obtaining primary callus deprived of the tracheary elements and induction of xylogenesis in the callus passaged to the new medium

zatopiony w eponie wykonano przy użyciu ultramikrotomu, zabarwiono metodą PAS i dobarwiano błękitem toluidyny i zamknięto w euparalu. Obserwacje mikroskopowe prowadzono przy użyciu mikroskopu OLYMPUS AX70 PROVIS. Elementy trachealne obserwowano w mikroskopie skaningowym.

WYNIKI

Pod wpływem egzogennej auksyny tkanka izolowanego rdzenia łodyg stawała się dosyć luźna – komórki rozklejały się i jednocześnie pojawiała się duża aktywność mitotyczna, przy czym ściany podziałowe zakładały się we wszystkich kierunkach (Ryc. 3a, b; Ryc. 4). Prowadziło to do powstania kalusa o guzłkowej strukturze.

Intensywność podziałów komórkowych zachodzących w komórkach rdzenia była różna u różnych eksplantatów. Zaobserwowano, że w obszarach, w których podziały były mniej liczne (a do takich należały rdzeń łodyg, na który nie podano auksyny i niektóre obszary rdzenia łodyg, na który podano auksynę) ściany podziałowe zakładały się prostopadle lub równoległe do długiej osi łodygi. W takich obszarach przypominających układem komórek strukturę rdzenia mogła zająć regeneracja liniowych naczyni.

Intensywnie dzielące się komórki dały natomiast początek guzłkom kalusa. W wyniku podziałów komórek rdzenia powstały kilku – kilkudziesięciokomórkowe kompleksy. Ściany podziałowe, które zakładały się w różnych orientacjach względem pierwotnej osi łodygi, były jednak prostopadle lub równoległe do powierzchni guzłków. Ponieważ wzrost komórek poszczególnych guzłków kalusa nie zachodził wzdłuż wybranej osi, powstawały struktury w przybliżeniu kuliste.

W poszczególnych „jednostkach” kalusa, (w poszczególnych guzłkach), nie można było wyróżnić preferowanego kierunku wzrostu, pomimo że tak powstały kalus znajdował się w układzie przepływowym, to znaczy źródło auksyny wciąż znajdowało się na jednym końcu tkanki, a ujście (czyli agar bez auksyny, do którego mogła ona dyfundować) na drugim. Komórki w obrębie guzłków różniły się kształtem: komórki na powierzchni guzłków były izodiametryczne, natomiast pod po-

wierzchnią występowały wydłużone komórki mięksiszowe, a jeszcze głębiej wydłużone elementy trachealne. W samym centrum guzłka występowały izodiametryczne komórki mięksiszowe (Fig. 3c).

W elementach trachealnych powstałych w kalusie pierwotnym i wtórnym występują otwarte perforacje (Fig. 3d). Wielkość perforacji członów naczyń kalusa jest zróżnicowana. W kalusie istnieje również zróżnicowanie typu perforacji: występują zarówno perforacje proste jak i perforacje złożone, podczas gdy w pędzie występują wyłącznie perforacje proste.

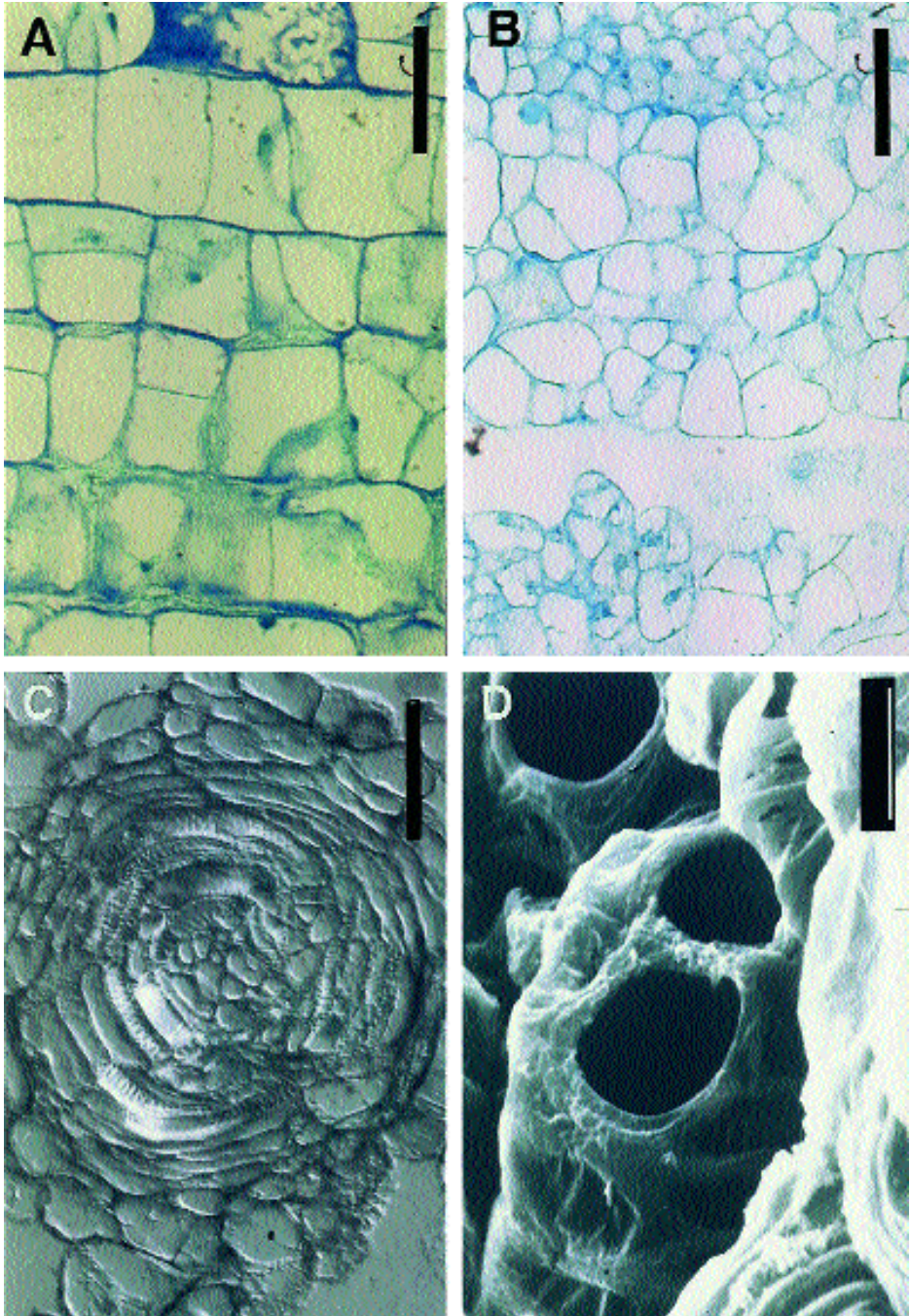
Ciągi elementów trachealnych w izolowanym rdzeniu łodyg i kalusie pierwotnym

Wyróżnicowane w eksplantatach ciągi elementów trachealnych miały różny przebieg przestrzenny, tak więc wyróżniono kilka typów, które były wykorzystywane w dalszej charakterystyce materiału (Ryc. 5).

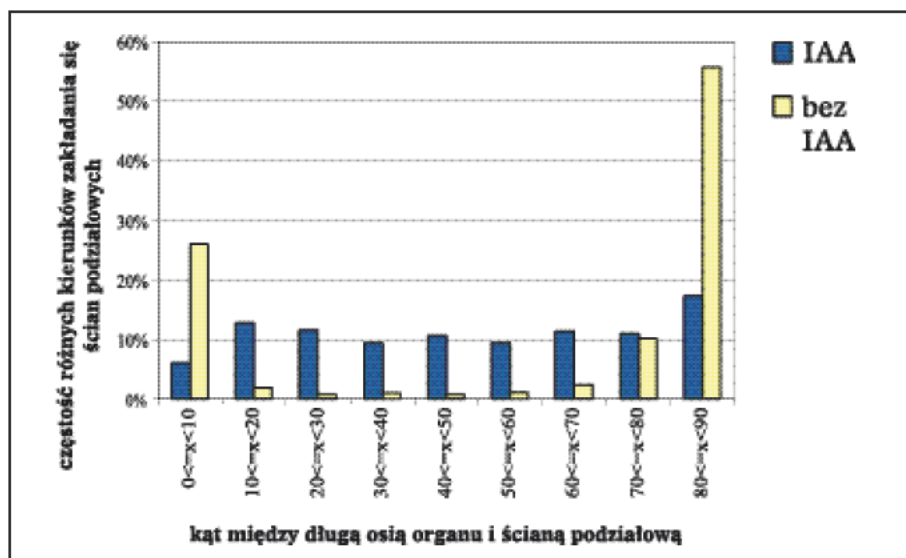
Liniowe ciągi zbudowane z komórek z dobrze wyrażoną osiowością (Typ 1), powstawały w wielu eksplantatach po podaniu auksyny na koniec apikalny (90% eksplantatów), a w znacznie mniejszej liczbie eksplantatów, u których auksynę podano na koniec bazalny (35%). Układy liniowe o długości od 200 μm do 800 μm , złożone z kilku – kilkunastu izodiametrycznych komórek ze słabo zaznaczoną polarnością (Typ 2), biegnące wzdłuż osi eksplantatu powstawały w końcu, na który podawano auksynę. Różnicowanie elementów trachealnych poprzedzone było w tym wypadku kilkoma, przeważnie poprzecznymi, podziałami komórek rdzenia. W wyniku tych podziałów powstały prawie izodiametryczne komórki, które następnie podjęły różnicowanie. Wzór zgrubień wtórnej ściany nie pozwalał na wyznaczenie osi polarności tych komórek.

W przypadku podania IAA na koniec bazalny pojawiały się układy wielokształtne (Typ 4), dla których niemożliwe było określenie uporządkowania w ciągi (długie osie i zgrubienia ściany wtórnej ułożone były w różnych orientacjach).

Układy elementów trachealnych u podstawy korzeni (Typ 5) tworzyły lejkowate rozszerzenia; można powiedzieć, że elementy trachealne „kierowały” się do korzenia, jednak poza tym lokalnym uporządkowaniem elementów trachealnych nie zaobserwowano wpływu korzeni na



Ryc. 3. A i B – półcienki przekroje podłużne przez tkankę izolowanego rdzenia łodygi w hodowli *in vitro*. A. z auksyną B. bez auksyny; pasek skali – 50 μm . C. Półcienki przekrój przez guzełek kalusa; pasek skali – 50 μm . D. Człon naczynia powstałego w kalusie. W mikroskopie skaningowym; pasek skali – 4 μm
Fig. 3. A-B Semi-thin longitudinal sections of stem pith parenchyma cultured *in vitro* A. with auxin, B. without auxin; scale bar – 50 μm . C. semithin section of callus nodule; scale bar – 50 μm . D. Vessel member formed in callus under scanning electron microscope; scale bar – 4 μm



Ryc. 4. Kierunki podziałów komórek rdzenia względem pierwotnej osi łodygi

Fig. 4. Orientation of cell divisions in pith parenchyma in respect to the original axis of the stem

organizację ciągów elementów trachealnych w eksplantacie.

We wszystkich wariantach doświadczenia pojawiały się eksplantaty, w których można było znaleźć układy kołowe, spiralne, kuliste i różne typy zawirowań i pętli (Typ 3). Można było zauważyć tendencję do częstszego ich występowania przy końcu bazalnym. W silnie kalusowaciej warstwie peryferycznej eksplantatu występowały wyłącznie ciągi o przebiegu kołowym i spiralnym. Wykonano rekonstrukcje ciągów elementów trachealnych na podstawie serii przekrojów. Okazało się, że w niektórych guzłkach o kształcie w przybliżeniu kulistym występowały układy kołowe, otaczające mięksiszowy „rdzeń” (Ryc. 6). Jak wspomniano wyżej, nawet w nieznacznie „wydłużonych” guzłkach przebieg naczyń nie był prostoliniowy. Uważne oglądanie takich ciągów elementów trachealnych z różnych stron pozwoliło stwierdzić, że oprócz zamkniętych pierścieni pojawiały się układy przypominające spiralę o zmieniającym się skoku. W guzłkach kalusa posiadających płatkowate uwypuklenia ciągi elementów trachealnych „wirujące” w obrębie poszczególnych płatów rozgałęziały się i łączyły z ciągami innych płatów.

Kształt grupy elementów trachealnych wyraźnie związany był z kształtem guzłka i tak,

w guzłkach ósemkowato przewężonych elementy trachealne przebiegały po ósemkowato zakrzywionym torze, natomiast w bardziej kulistych były one ciasno zwiniętymi spiralami. Takie płaskie spirale na grubych preparatach odręcznych sprawiały wrażenie kulistych.

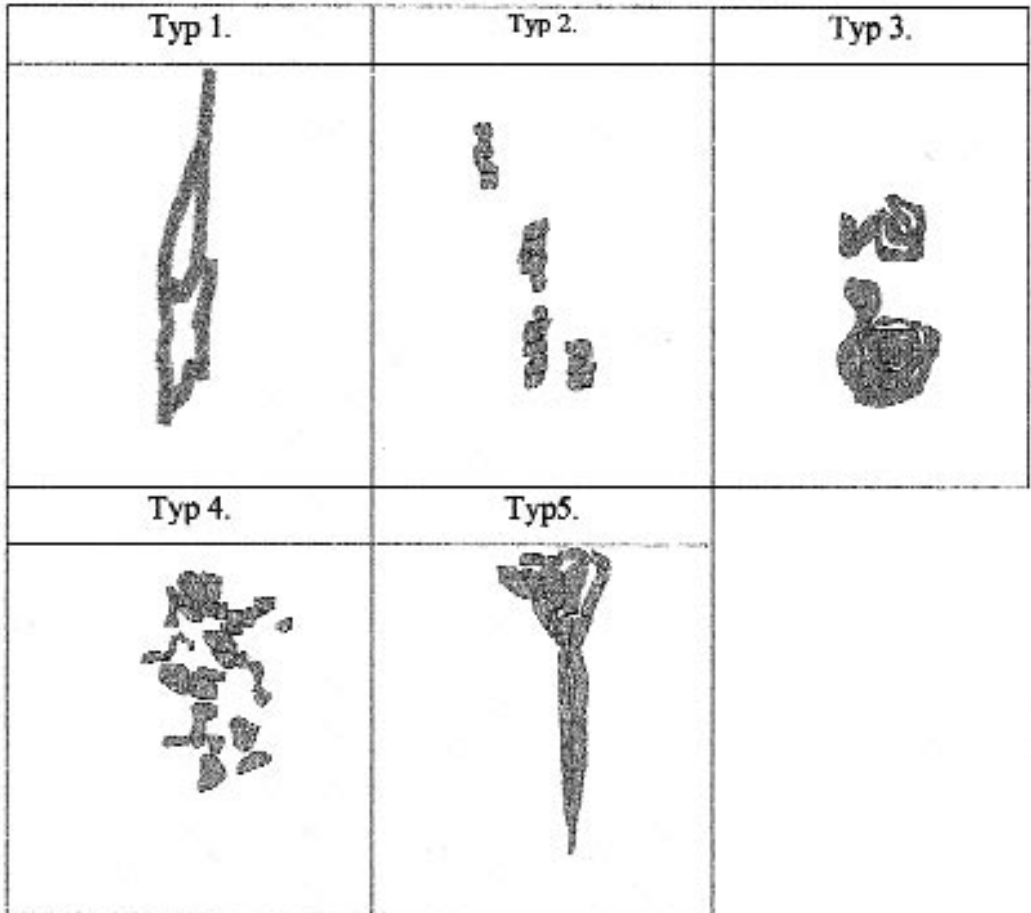
W wariantach, w których nie podawano auksyny, w niektórych guzłkach kalusa wykształconego na końcach eksplantatu powstawały spiralne układy elementów trachealnych, przy czym ksylogeneza była znacznie mniej intensywna niż w wariantach z egzogenną auksyną.

Ciągi elementów trachealnych w kalusie wtórnym

We wtórnej tkance kalusowej, która wzrastała na powierzchni kalusa pierwotnego podczas trwania doświadczenia, elementy trachealne powstawały bardzo licznie w wariantach z auksyną i sporadycznie w wariantach bez auksyny.

Naczynia, które powstały w tkance kalusowej, narastającej po pasażowaniu kalusa pierwotnego na nową pożywkę nie miały przebiegu prostoliniowego, lecz były spiralami. Przebieg tych ciągów był taki jak kształt guzłków kalusa, w których powstawały.

W niektórych fragmentach tkanki kalusowej zachodziła ryzogeneza. Elementy trachealne



Ryc. 5. Wyróżnione typy układów elementów trachealnych powstałych w tkance izolowanego rdzenia i powstającym kalusie pod wpływem auxyny podanej na jeden koniec eksplantatu

Typ 1. liniowe ciągi, o długości przekraczającej 1000 μm , utworzone z komórek z wyraźnie zaznaczoną długą osią leżącą zgodnie z kierunkiem przebiegu ciągu. Typ 2. krótkie, liniowe ciągi złożone z komórek izodiametrycznych. Typ 3. ciągi spiralne. Typ 4. krótkie, rozgałęzione ciągi złożone z komórek o różnym kształcie i orientacji. Typ 5. ciągi charakterystyczne dla miejsc inicjacji korzeni przybyszowych

Fig. 5. Different types of arrangement of tracheary elements formed in isolated pith parenchyma and in arising callus under the influence of auxin supplied to the one end of explant

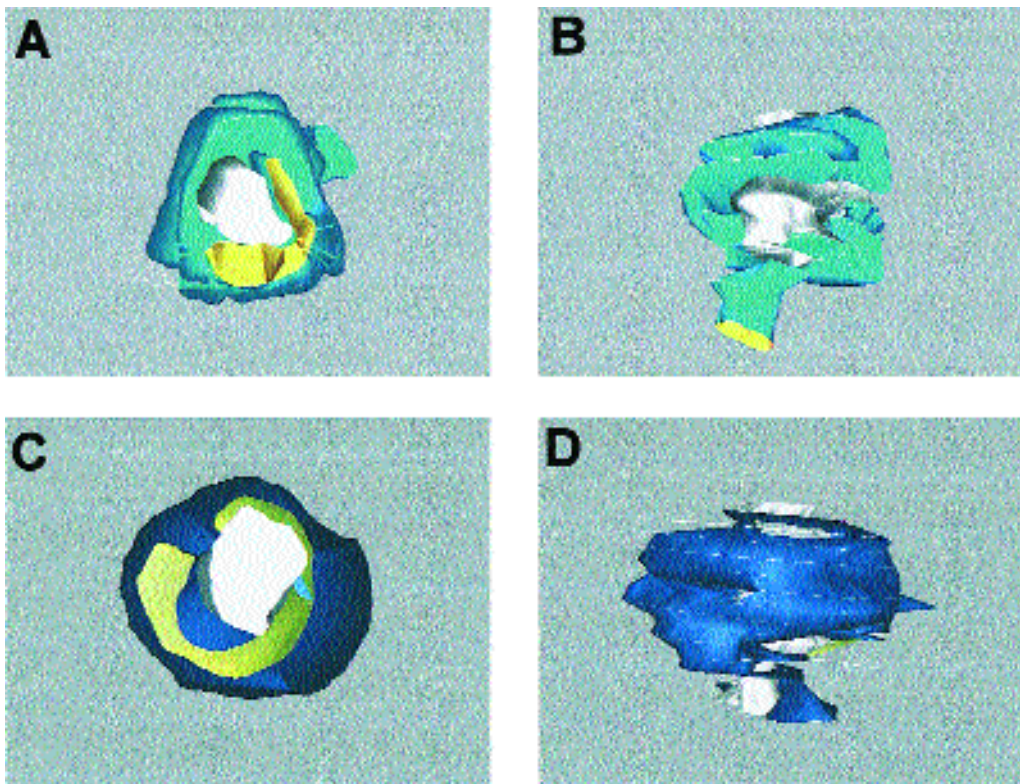
Type 1. linear strands of a length exceeding 1000 μm , consisted of cells with long axis parallel to the direction of strands. Type 2. short, linear strands consisted of isodiametrical cells. Type 3. spiral strands. Type 4. short, branched strands consisted of cells of different shapes and orientation. Type 5. strands characteristic for the place of origin of the initiation of adventitious roots

w korzeniu miały orientację zgodną z osią korzenia, natomiast u podstawy korzeni występowały charakterystyczne lejkowate rozszerzenia wiązek; elementy trachealne zorientowane w różnych kierunkach „kierowały” się do korzenia. Nie zaobserwowano ciągów łączących korzeń ze źródłem auxyny, czyli kulką anionitu umieszczoną na szczycie kopuły kalusa pierwotnego.

DYSKUSJA

1. Wzrost tkanki umieszczonej pomiędzy źródłem i ujściem ausyny

Powszechnie przyjęty jest pogląd, że w powstawaniu i utrzymywaniu osi polarności rośliny kluczową rolę pełni polarny transport auxyny (Estelle 1998; Hamann 2001; Fischer i wsp. 1997; Hadfi i wsp. 1998). W organach roślin-



Ryc. 6. Rekonstrukcje budowy guzeczka kalusa z ciągami elementów trachealnych (kolor niebieski) otaczający mięsistą rdzeń (kolor biały). Kolorem żółtym zaznaczono światło elementów trachealnych

A-B – Układ kołowy

C-D – Układ spiralny

Fig. 6. Reconstruction of structure of callus nodule with tracheary strands (blue color), surrounding parenchymatous pith (white color). Lumina of tracheary elements are coloured with yellow

A-B Circular arrangement of tracheary elements

C-D Spiral arrangement of tracheary elements

nych odpowiednimi zabiegami można lokalnie zmienić oś polarności poprzez podanie auksyny (Sachs 1991). Pojawia się jednak pytanie: w jakim stopniu utrzymanie polarności lub indukcja polarności w początkowo niepolarnej tkance zależy wyłącznie od polarnego transportu auksyny, a w jakim stopniu od innych czynników pochodzących ze środowiska zewnętrznego i wewnętrznego organizmu lub jego części.

W doświadczeniach prezentowanych w niniejszej pracy utrzymanie polarności w tkance eksplantatu pierwotnego umieszczonego pomiędzy źródłem auksyny, a jej ujściem przejawia się wytworzeniem liniowych ciągów elementów trachealnych wzdłuż pierwotnej osi

polarności. W znacznej jednak części kalusa powstałego w wyniku podziałów eksplantatu pierwotnego nie powstają ciągi liniowe, lecz kołowe i spiralne, a układ komórek jest bardzo silnie zmieniony w stosunku do układu wyjściowego. Dlaczego zatem, pomimo potencjalnych możliwości utrzymania polarnego transportu auksyny (układ źródło i ujście na przeciwnych końcach tkanki), w znacznej części eksplantatu dochodzi do całkowitego zniekształcenia oryginalnego wzoru komórek?

W tym sztucznym układzie doświadczalnym tkanka rdzenia jest pozbawiona relacji międzykomórkowych, jakie występowały w organie. Jedną ze zmian, jakiej tkanka rdzenia doznała

po izolacji z łodygi jest uwolnienie jej od wpływu tkanek zewnętrznych. Zgodnie z obserwacją Lintilhaca (1984) orientacja ścian podziałowych zależy od rozkładu naprężeń mechanicznych, mianowicie ściany podziałowe wykazują tendencję do układania się prostopadłe do jednego z naprężeń głównych (minimalnego lub maksymalnego). Innymi słowy ściana podziałowa zakłada się w płaszczyźnie wolnej od naprężeń ścinających. Trajektorie naprężeń głównych są prostopadłe oraz równoległe do powierzchni, więc rozkład naprężeń mechanicznych w tkance zależy bezpośrednio od kształtu danej struktury (Lintilhac i Vesecky 1980). W izolowanych na skutek rozklejenia komórkach rdzenia orientacja ścian podziałowych była przypadkowa względem pierwotnej osi organu, ale zależna od kształtu poszczególnych struktur – na początku komórek rdzenia, a później guzłków kalusa. Kształt guzłków kalusa zwykle odbiegał mniej lub bardziej od kształtu kulistego: były one nieznacznie wydłużone, można w nich było wyróżnić płaty lub lokalne uwypuklenia. Zmiana kształtu powierzchni organu wywoływała zmianę rozkładu naprężeń głównych, co z kolei pociągało za sobą odpowiednią orientację podziałów. Tak więc organizacja podziałów komórkowych jest częściowo samoorganizującym się procesem.

Ponieważ guzłki kalusa są ze sobą luźno połączone, to każdy z guzłków można traktować jak niezależne centrum morfogenetyczne. Auksyna niewątpliwie tworzy system informacji pozycyjnej, jednak mieści się on w granicach określonych kształtem ciała rośliny (organu). W przypadku kalusa pole morfogenetyczne ogranicza się przypuszczalnie do poszczególnych guzłków.

2. Polarność transportu auksyny i różnicowanie naczyń

Jedną ze szczególnych cech indukcji tkanki naczyniowej przez auksynę jest to, że podanie źródła auksyny wywołuje pojawienie się liniowego ciągu, przedłużającego się w kierunku bazalnym od miejsca podania (Sachs 1981a). Jest to intrygująca właściwość, ponieważ różnicowanie zachodzi wzdłuż nitki czy wiązki komórek (wzdłuż „kanału”, sąsiadującego z parenchymatyczną tkanką). Kanalizacja prowadzi do pojawiania się kanałów, a nie całych „płatów” lub przestrzeni objętych różnicowaniem. Praca

Mattsona i wsp. (1999) z zastosowaniem inhibitorów polarnego transportu auksyny stanowi doskonałe eksperymentalne potwierdzenie roli, jaką pełni polarny transport auksyny w ciągłości wiązek przewodzących oraz ograniczeniu różnicowania ciągów do wąskich pasm, czyli właśnie w kanalizacji. Na gruncie hipotezy kanalizacji można wyjaśnić powstanie liniowych naczyń, zbudowanych z komórek o dobrze wyróżnionej osi.

a) Źródło polarności komórek rdzenia

Pojawia się w związku z tym pytanie, czy polarność ta została indukowana przez auksynę podaną na jeden koniec i przemieszczającą się początkowo dyfuzyjnie przez tkankę rdzenia w dół gradientu koncentracji (od źródła auksyny – koralik anionitu, do jej ujścia – agar nie zawierający auksyny), czy też jest pierwotną właściwością komórek rdzenia, odpowiadającą polarności występującej w łodydze *in situ*.

Gdyby polarny transport auksyny był wynikiem indukcji pod wpływem początkowo dyfuzyjnego przemieszczania się auksyny przez tkankę parenchymy, to należałoby oczekiwać porównywalnych częstości eksplantatów z regeneracyjnymi ciągami elementów trachealnych, bez względu na to czy auksynę podano na koniec bazalny, czy apikalny. Tymczasem częstość eksplantatów, w których powstały długie, liniowe ciągi zbudowane z komórek o dobrze wyrażonej osiowości, penetrujące cały wycinek rdzenia była wyższa po podaniu auksyny na koniec apikalny w porównaniu z częstością powstawania takich ciągów po podaniu auksyny na koniec bazalny, co wskazuje, że powstanie tego typu ciągów jest raczej przejawem istnienia pamięci o oryginalnej polarności. Pojawienie się obserwowanej różnicy można wyjaśnić w oparciu o zdolność do polarnego transportu auksyny przez tkankę rdzenia łodygi i zachowanie tej zdolności po izolacji. Istnienie trudnej do odwrócenia silnej polarności, której podłożem jest transport auksyny jest dość zaskakujące. Co prawda, badania nad zdolnością rdzenia łodyg cynii do polarnego transportu auksyny nie były prowadzone, jednak wyniki badań nad innymi obiektami wskazują, że rdzeń albo nie transportuje auksyny polarnie, albo polarność jest słaba (Warren-Wilson i wsp. 1991; Shel-drake 1973).

b) lokalna polarność w kalusie

Wyniki badań nad istnieniem polarności transportu auksyny w tkance kalusowej świadczą o tym, że przemieszczanie się auksyny w tej tkance ma charakter dyfuzji (Jefferies i Northcote 1967), a tkanka kalusowa jest jednorodna pod względem kierunku transportu auksyny. Wyniki doświadczeń Wetmore i Riera (1963) nad różnicowaniem elementów trachealnych w kalusie, na którego szczycie umieszczano błocek agarowy z auksyną także świadczą o braku indukcji długodystansowej polarności w kalusie.

Opisane w pracy występowanie naczyń w kalusie dostarcza pośrednich dowodów, że w tej tkance istniała lokalna polarność kołowa, a przebieg naczyń odzwierciedla drogi polarnego transportu auksyny, jaki dokonywał się w komórkach podczas różnicowania (Sachs i Cohen 1982, Kurczyńska 1989, Kurczyńska i Hejnowicz 1991).

Wyniki badań nad charakterem transportu auksyny w większym fragmencie tkanki kalusowej, na podstawie których stwierdzono brak polarności transportu (Jefferies i Northcote 1967) nie mogą być interpretowane jako brak polarności w ogóle. Nie uwzględniają one lokalnych warunków i trwałej polarności kołowej, która nie jest zjawiskiem wyjątkowym w tkankach roślinnych (Hejnowicz i Kurczyńska 1987; Lev-Yadun i Aloni 1990).

3. Umiejscowienie ksylemu w kalusie

W nienaruszonych roślinach pasma prokambium i wiązki przewodzące pojawiają się zgodnie z charakterystycznym dla gatunku wzorem w określonych miejscach. Hipoteza kanalizacji Sachs'a wyjaśnia rolę, jaką pełni polarny transport auksyny w tworzeniu ciągów elementów przewodzących w postaci podłużnych pasm oraz w zapobieganiu indukcji różnicowania w parenchymie, nie tłumaczy jednak lokalizacji prokambium. Warren-Wilson i Warren-Wilson (1984), nie ujmując nic ze znaczenia kanalizacji transportu auksyny w powstawaniu liniowych ciągów komórek przewodzących wzdłuż szlaków jej transportu zaproponowali, że w umiejscowieniu prokambium działa jakiś mechanizm rozpoznawania współrzędnych polarnych komórek. Na podstawie doświadczeń z zakrywaniem powierzchni zranienia stworzyli oni 'teorię wolnej powierzchni' ('free surface theory') (Warren-Wilson i Warren-Wilson

1961, Warren-Wilson i Warren-Wilson 1984), według której prokambium czy kambium tworzy się równoległe do każdej (sztucznej i naturalnej) wolnej powierzchni, w pewnej odległości od niej; floem odkładany jest na stronę zwróconą do powierzchni, a ksylem na stronę przeciwną. W materiale doświadczalnym opracowanym w niniejszej pracy naczynia nie dochodziły do powierzchni guzków, lecz różnicowały się w ich wnętrzu, przy czym nie obserwowano układu promienistego, lecz koncentryczny, co właśnie może być skutkiem założenia się prokambium równoległe do powierzchni guzka.

Warren-Wilson i Warren-Wilson (1984) stawiają założenie, że oddziaływanie wolnej powierzchni na tkanki leżące głębiej odbywa się poprzez powstający w tkance gradient jakiegoś nieokreślonego bliżej czynnika rozchodzącego się od odkrytej powierzchni do wnętrza; kambium może powstać tylko w jednym położeniu, określonym stężeniem (poziomem) tego czynnika, natomiast produkowanie ksylemu i floemu przez kambium jest zależne od rozpoznania kierunku tego gradientu (Warren-Wilson i Warren-Wilson 1984). Zaproponowana przez Warren-Wilsonów teoria gradientu indukcyjnego ma pewne mankamenty:

- nie określono jaki czynnik uczestniczy w przekazywaniu informacji pozycyjnej,
- nie można wyjaśnić w jaki sposób gradient substancji miałby określać kierunki podziałów w tkance,
- co stanowi źródło morfogenu, a co jego ujście. Wspomniane problemy wymagają dalszych badań, które ujawnią mechanizm regulujący pozycję prokambium. Być może badania te będą wymagały odmiennego podejścia badawczego: informacja pozycyjna nie musi mieć charakteru chemicznego – lecz fizyczny, związany z oddziaływaniami mechanicznymi.

SUMMARY

The arrangement of tracheary elements and elongated parenchymatous cells reflects some aspects of tissue polarity. In some regions of pith parenchyma placed between source and sink of auxin original polarity lasts in culture, and it is expressed in formation of long vessels composed of cells with well expressed axial

features. However, large mass of callus arising from pith parenchyma in the system of the exogenous auxin gradient does not exhibit any axial pattern of growth: division walls are positioned in any orientation to the organ axis and elongational growth is not axial, which leads to the formation of globular nodules of callus. In the tracheary elements differentiated in callus perforation plates are opened, thus they are vessel members. In callus there was no formation of linear vessels, only circular or spiral vessels were formed. The route of vessels formed inside nodules of callus depends on the shape of nodule.

LITERATURA

- Benjamins R., Quint A., Weijers D., Hooykaas P., Offringa R.** 2001, The PINOID protein kinase regulates organ development in *Arabidopsis* by enhancing polar auxin transport. *Development* 128: 4057-4067.
- Berleth T., Juergens G.** 1993, The role of MONOPTEROS gene in organising the basal body region of the *Arabidopsis* embryo. *Development* 118: 575-587.
- Chen J.G., Ullah H., Young J.C., Susmann M.R., Jones A.M.** 2001, ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 15: 902-911.
- Dengler N.** 2001, Regulation of vascular development. *Journal of Plant Growth Regulation* 20: 1-13.
- Estelle M.** 1992, The plant hormone auxin: Insight in sight. *BioEssays* 14: 439-444m
- Estelle M.** 1998, Polar auxin transport: new support for an old model. *The Plant Cell* 10: 1775-1778m
- Fischer Ch., Speth V., Fleig-Eberenz S., Neuhaus G.** 1997, Induction of zygotic polyembryos in wheat: influence of auxin polar transport. *The Plant Cell* 9: 1767-1780.
- Gersani M., Sachs T.** 1984, Polarity reorientation in beans expressed by vascular differentiation and polar auxin transport. *Differentiation* 25: 205-208.
- Hadfi K., Speth V., Neuhaus G.** 1998, Auxin-induced developmental patterns in *Brassica juncea* embryos. *Development* 125: 879-887.
- Hamann T.** 2001, The role of auxin in apical-basal pattern formation during *Arabidopsis* embryogenesis. *Journal of Plant Growth Regulation* 20: 292-299.
- Hejnowicz Z., Kurczyńska E.U.** 1987, Occurrence of circular vessels above axillary buds in stems of woody plants. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 56: 415-419.
- Jeffs R.A., Northcote D.H.** 1967, The influence of indole-3-acetic acid and sugar on the pattern of induced differentiation in plant tissue culture. *Journal of Cell Science* 2: 77-88.
- Kurczyńska E.** 1989, Polarny przepływ auksyny a różnicowanie naczyń na przykładzie izolowanych odcinków łodyg jesionu (*Fraxinus excelsior* L.). Praca doktorska. Uniwersytet Śląski w Katowicach.
- Kurczyńska E.U., Hejnowicz Z.** 1991, Differentiation of circular vessels in isolated segments of *Fraxinus excelsior*. *Physiologia Plantarum* 83: 275-280.
- Lev-Yadun S., Aloni R.** 1990, Vascular differentiation in branch junctions of trees: circular patterns and functional significance. *Trees* 4: 49-54.
- Lintilhac P.M.** 1984, Positional controls in meristem development: a caveat and an alternative. W: *Positional Controls in Plant Development*. Wyd. P.B. Barlow D.J. Carr str. 83-106 Cambridge University Press.
- Lintilhac P.M., Vesecky T.** 1980, Mechanical stress and cell wall orientation in plants I. Photoelastic derivation of principal stresses in a model. With a discussion of a concept of axillarity and the significance of the „arcuate shell zone”. *American Journal of Botany* 67: 1477-83.
- Mattson J., Sung Z.R., Berleth T.** 1999, Responses of plant vascular systems to auxin transport inhibition. *Development* 126: 2979-2991.
- Mayer U., Buttner G., Jurgens G.** 1993, Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: studies of the role of the gnom gene. *Development* 117: 149-162.
- Mitchison G.J.** 1980, A model for vein formation in higher plants. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 207: 79-109.
- Muller A., Guan C., Galweiler L., Tanzler P., Huijser P., Marchant A., Parry G., Bennett M., Wisman E., Palme K.** 1998, AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J.* 17: 6903-6911.
- Murashige T., Skoog F.** 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

- Rayle D.L., Quatrakul R., Hertel R.** 1969, Effects of auxins on the auxin transport system in coleoptiles. *Planta* 87: 49-53.
- Sachs T.** 1968, The role of the root in the induction of xylem differentiation in peas. *Annals of Botany* 32: 391-399.
- Sachs T.** 1981a, Patterned Differentiation of Vascular Tissues. Academic Press Inc., str. 181-192.
- Sachs T.** 1981b, The controls of patterned differentiation of vascular tissues. *Advances in Botanical Research* 9: 151-262.
- Sachs T.** 1981c, Polarity changes and tissue organization in plants. In *Cell Biology 1980-1981* Ed. H.G. Schweiger, str. 489-96, Springer Verlag, Berlin.
- Sachs T.** 1991, Pattern Formation in Plant Tissues, Cambridge University Press, Developmental and Cell Biology Series.
- Sachs T., Cohen D.** 1982, Circular vessels and the control of vascular differentiation in plants. *Differentiation* 21: 22-26.
- Scheldrake A.R.** 1973, Auxin transport in secondary tissues. *Journal of Experimental Botany* 24: 87-96.
- Steinmann T., Geldner N., Grebe M., Mangold S., Jackson C.L., Paris S., Galweiler L., Palme K., Jurgens G.** 1999, Coordinated Polar Localization of Auxin Efflux Carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* 286: 316-318.
- Warren-Wilson J., Warren-Wilson P.M.** 1961, The position of regenerating cambia – a new hypothesis. *The New Phytologist* 60: 63-73.
- Warren-Wilson J., Warren-Wilson P.M.** 1984, Control of tissue patterns in normal development and in regeneration. W: *Positional Controls in Plant Development* Wyd. P.B. Barlow D.J. Carr, str. 225-280, Cambridge University Press.
- Warren-Wilson J., Warren-Wilson P.M.** 1993, Mechanisms of auxin regulation of structural and physiological polarity in plants, tissues, cells and embryos. *Australian Journal of Plant Physiology* 20: 555-71.
- Warren-Wilson J., Warren-Wilson P.M., Walker E.M.** 1991, Patterns of tracheary differentiation in lettuce pith explants: positional control and temperature effects *Annals of Botany* 68: 109-128.
- Wetmore R.H., Rier J.P.** 1963, Experimental induction of vascular tissues in callus of angiosperms. *American Journal of Botany* 50: 418-430.