

ZRÓŻNICOWANIE WZROSTU TKANEK HIPOKOTYLU *ZINNIA ELEGANS* L. W ODPOWIEDZI NA EGZOGENNĄ AUKSYNĘ

Differences in growth of tissues of the hypocotyl of *Zinnia elegans* L. in answer to the exogenous auxin

Aleksandra RUSIN¹, Tomasz 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

Egzogenna auksyna podana na segmenty hipokotyli *Zinnia elegans* L. wywołuje odmienną odpowiedź w komórkach epidermy i kory pierwotnej, które intensywnie zwiększają swoje rozmiary i w komórkach tkanek systemu przewodzącego oraz parenchymie rdzenia, które zaczynają się dzielić. W tkankach zewnętrznych po podaniu egzogennej auksyny blaszki środkowe ulegają strawieniu i komórki oddzielają się od siebie. Oddzielanie komórek zaczyna się od ścian stycznych, następnie proces ten zachodzi w ścianach promieniowych, a ściany poprzeczne oddzielają się jako ostatnie. W segmentach hipokotyli hodowanych *in vitro*, w obecności egzogennej auksyny wzrost jest izotropowy, podczas gdy bez egzogennej auksyny zachodzi przede wszystkim w kierunku poprzecznym.

WSTĘP

Komórki ciała rośliny połączone są za pomocą blaszek środkowych i nie przemieszczają się względem siebie. W związku z tym wzrost sąsiadujących komórek jest współzależny. Taki wzrost nosi nazwę wzrostu symplastycznego. Wzrost symplastyczny ma ważne konsekwencje dla regulacji wzrostu organów. Tkanka o dużej sztywności, jak epiderma w pędzie, ogranicza wzrost tkanek wewnętrznych o mniejszej sztywności i zarazem wzrost całego organu (Kutschera 1991; Niklas 1999).

Powiększanie rozmiarów komórek (odkształcenie) rozpoczyna się pod wpływem

przyłożenia siły rozciągającej. Aby mogło dojść do nieodwracalnego odkształcenia ściany musi być przekroczona pewna wartość progowa turgoru (Y) (Lockhardt 1965). Powiększanie rozmiarów jest proporcjonalne do różnicy wartości turgoru i wartości progowej przy danym współczynniku określającym rozciągliwość ściany. Relaksacja naprężeń w ścianie, umożliwiającą nieodwracalne odkształcenie ściany jest spowodowana bądź biochemiczną modyfikacją składników ściany (McCann i Roberts 1994), bądź ich przebudową (Cosgrove 1987; McQueen-Mason 1995; McQueen-Mason i Cosgrove 1994; McQueen-Mason i Cosgrove 1995). Wiele prac wskazuje, że istotną rolę w wydłużaniu komórek odgrywają enzymy odpowiedzialne za biochemiczną modyfikację materiału wypełniającego ściany, przede wszystkim pektyn, ponieważ równocześnie ze wzrostem powierzchniowym ściany zachodzi włączanie nowych polimerów (Brett i Waldron 1996; Stolle-Smith i in. 1999).

Wiadomo, że auksyna stymuluje wzrost wyrostków łodyg soi, grochu, koleoptyli owsa (Brummell i Hall 1987) oraz nienaruszonych roślin (Yang i in. 1993). Auksyna indukuje wzrost organu poprzez rozluźnianie ściany komórek epidermy ograniczającej wzrost (Lockhardt 1965; Masuda i Yamamoto 1972; Brummell i Hall 1987; Kutschera 1987). Zwiększenie plastyczności ścian komórek epidermy umożliwia wzrost wydłużeniowy organu. W odpowiedzi wzrostowej na auksynę można wyróżnić dwie fazy: fazę szybkiej odpowiedzi pojawiającej się po 20 minutach od podania auksyny (zmiany w funkcjonowaniu plazmalemy i w po-

ziomie transkrypcji różnych genów) (Theologis 1986) i fazę przedłużonego wzmożenia wzrostu (Yang i in. 1993; Pope 1993). W fazie przedłużonej odpowiedzi wzrostowej zachodzi aktywacja wielu genów (Ballas i in. 1993), synteza i hydroliza ściany (Brete-Harte 1991), synteza białek (Edelman i Schopfer 1989). O ile wydarzenia związane z szybką odpowiedzią wzrostową były bardzo często przedmiotem badań, to problem długoterminowego wzmożenia wzrostu pod wpływem auksyny był podejmowany znacznie mniej intensywnie. Celem badań była analiza wzrostu tkanek cynii podczas długotrwałego doświadczenia z egzogenną auksyną.

MATERIAŁY I METODY

Sterylnie odcinki hipokotyli o długości 10 mm, pobrane z 14 dniowych roślin 3 cm poniżej liścieni umieszczano na pożywce MS (Murashige i Skoog 1962). Na eksplantaty podawano 10

Immunofluorescencyjne barwienie mikrotubul przeprowadzono zgodnie z procedurą podaną w pracy Hejnowicza i in. (2000).

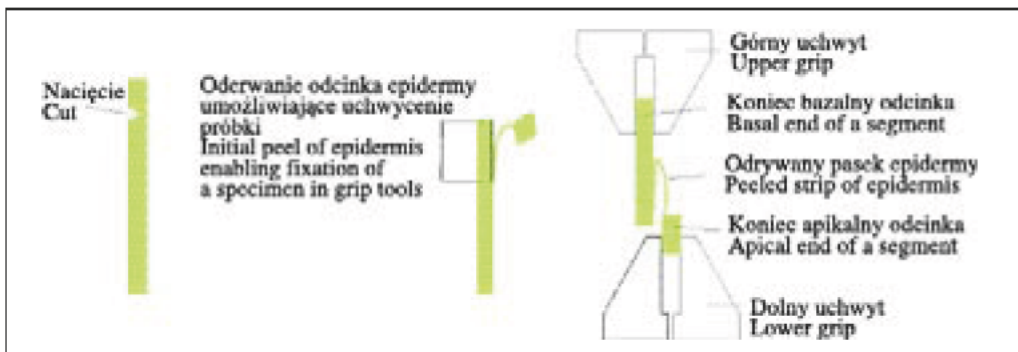
Obecność ligniny i suberyny sprawdzano na podstawie autofluorescencji ścian komórek (Hawkins i Boudet 1996).

WYNIKI

Po 14 dniach kultury *in vitro* odcinki, na które podano egzogenną auksynę wydłużyły się średnio o 23% długości początkowej. W tym samym czasie odcinki bez auksyny urosły średnio o 12%. Różnice między tymi średnimi są istotne statystycznie (Tabela 1).

1. Rozrost tkanek zewnętrznych w odcinkach hipokotyli

Po podaniu auksyny na odcinki hipokotyli tkanki zewnętrzne (epiderma i kora pierwotna) podjęły wzrost, przy czym był on znacznie bardziej intensywny niż części wewnętrznych od-



Ryc. 1. Sposób przeprowadzenia testu odrywania 180°
Fig. 1. Diagram of peel test 180°

kulek anionitu DOWEX X10, z których każda zawierała około 30 pg IAA (Rusin 2000).

Właściwości mechaniczne blaszek środkowych sprawdzano stosując test odrywania (tak zwany „peel test 180°”) przy użyciu maszyny wytrzymałościowej Synergie 100. Podczas testu odrywano pasek o szerokości około 1mm złożony z epidermy i jednej- dwóch warstw kory pierwotnej i wyznaczano wartość siły użytej do odrywania tego fragmentu (Ryc. 1).

Obserwacje mikroskopowe przeprowadzano przy użyciu mikroskopu OLYMPUS AX70 PROVIS i OLYMPUS SZH10.

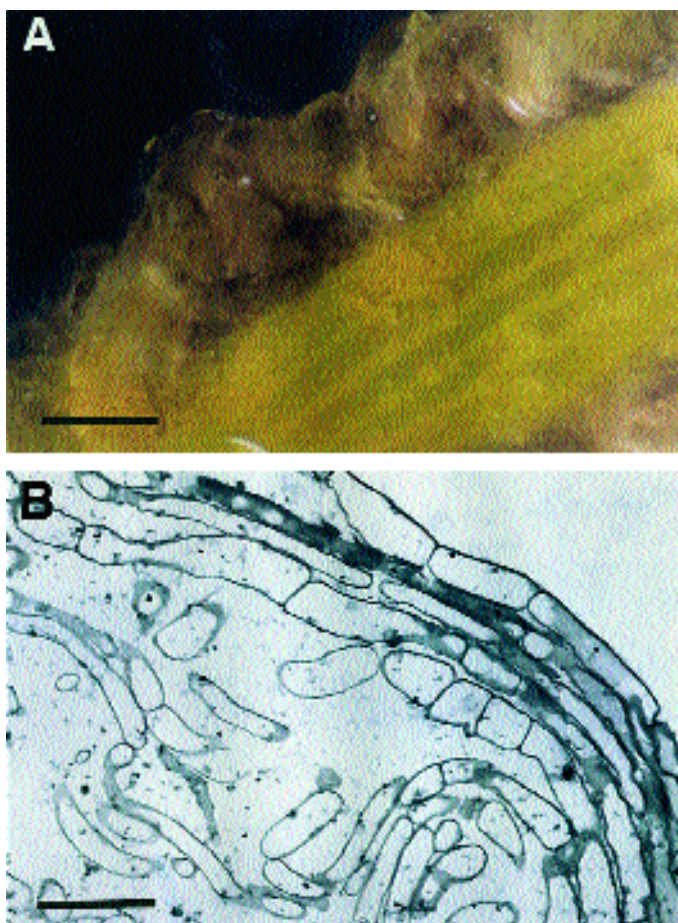
cinka (wiązki przewodzące i rdzeń), na skutek czego tkanki zewnętrzne fałdowały się „na powierzchni” tkanek wewnętrznych (Ryc. 2). Taki efekt po podaniu auksyny występował bez względu na to czy auksynę podano na koniec bazalny czy na apikalny. W wariantach bez auksyny powierzchnia eksplantatów pozostawała gładka, a na końcach obserwowano powstawanie kalusa.

Pofałdowanie powierzchni odcinków z auksyną widoczne było już w trzecim dniu w kulturze, w kolejnych dniach zachodził dalszy wzrost epidermy i kory pierwotnej, w związku

Tabela 1. Porównanie średniej długości odcinków hipokotyli hodowanych *in vitro* przez 14 dni z auksyną (30 pg / odcinek) i bez auksyny

Table 1. Comparison of the mean length of hypocotyl segments cultured *in vitro* for 14 days with and without exogenous auxin

Sposób traktowanie Experimental treatment	Liczba odcinków (n) Number of segments (n)	Średnia długość [mm] Mean length [mm]	Odchylenie standardowe Standard deviation deviation	wartość p (t – test dla prób niezależnych) p value (t – test for independent samples)
Odcinki bez IAA Segments without IAA	21	11,26	0,75	0,014
Odcinki z IAA Segments with IAA	25	12,32	1,76	



Ryc. 2. A – Pofałdowanie powierzchni odcinka hipokotyli cynii na skutek intensywnego wzrostu epidermy i kory pierwotnej po podaniu egzogennej IAA; pasek skali – 1mm. B – półcienki przekrój podłużny promieniowy przez hipokotyl cynii po podaniu egzogennej IAA; pasek skali – 100 μm

Fig. 2. A – folding of the surface of the hypocotyl segment in a consequence of the intensive expansion of epidermis and primary cortex after application of the exogenous IAA; scale bar – 1 mm. B – semithin, longitudinal section of the hypocotyl segment after application of the exogenous IAA; scale bar – 100 μm

z czym rosła wysokość fałdów. Fałdy te tworzyły się poprzecznie do długiej osi, chociaż niekiedy fałd ulegał rozdzieleniu w efekcie czego po jednej stronie odcinka fałdy były gęstsze. Na preparatach mikroskopowych widać, że komórki kory były bardzo luźno ułożone (Ryc. 2). Komórki epidermy były połączone za pomocą ścian poprzecznych i ścian podłużnych promieniowych natomiast blaszki środkowe ścian podłużnych styecznych uległy rozklejeniu, co spowodowało odstawanie warstw komórek od siebie. Podziały, które zachodziły w części komórek dzieliły komórki poprzecznie do długiej osi. Z komórek kory i epidermy nie wytwarzały się centra merystematyczne, charakterystyczne dla komórek tkanek wewnętrznych. W komórkach na końcach odcinków zaszła lignifikacja i suberynizacja, co zapobiegało rozklejaniu komórek na końcach odcinków.

2. Kierunki wzrostu komórek epidermy

Porównano wymiary komórek epidermy przed doświadczeniem, po 2 h, 24 h i 72 h oraz po 7 i 14 dniach hodowli z auksyną i bez auksyny.

Komórki epidermy w kulturze *in vitro* z egzogenną auksyną były znacznie większe od komórek epidermy przed doświadczeniem oraz od komórek bez egzogennej auksyny (Tabela 2).

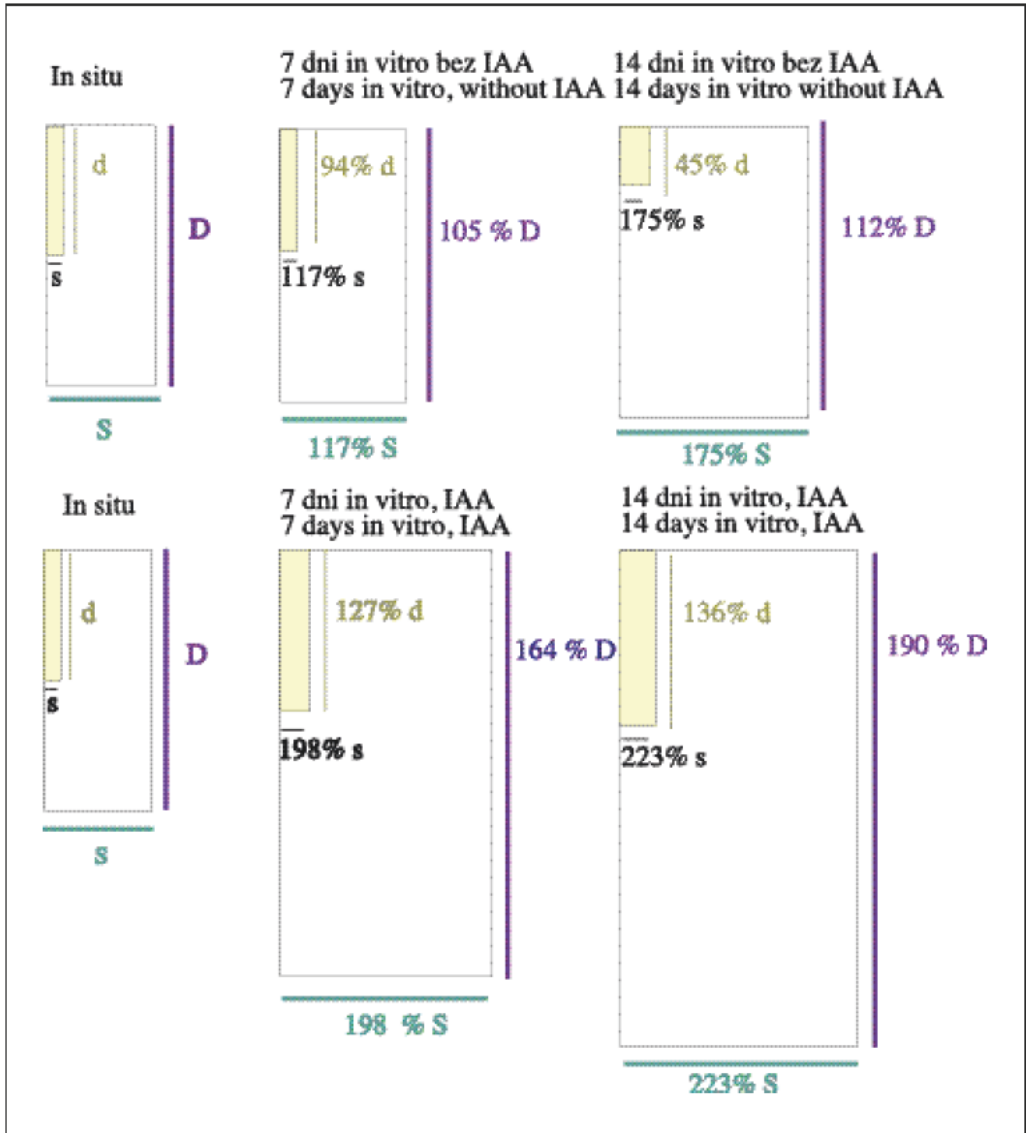
Ponieważ w epidermie zachodzą podziały poprzeczne, na podstawie analizy wymiarów komórek przed i po okresie kultury *in vitro* można wnioskować jedynie o wzroście epidermy w kierunku obwodowym. Wzrost epidermy w kierunku obwodowym wyliczono jako stosunek średniej szerokości komórek przed doświadczeniem do średniej szerokości komórek po danym okresie hodowli. Aby ocenić wzrost (zmianę długości) badanego fragmentu epidermy w kierunku podłużnym zmierzono długość obrysu boku eksplantatu.

Wzrost epidermy ujęto graficznie na Ryc. 3. Epiderma odcinków z auksyną rosła prawie izotropowo. Wzrost epidermy odcinków z auksyną był bardziej intensywny niż wzrost epidermy bez auksyny. W odcinkach bez auksyny dominującym kierunkiem wzrostu był wzrost na szerokość, szczególnie widoczny w drugim tygodniu kultury.

Tabela 2. Zmiana średnich wymiarów komórek epidermy w różnych etapach doświadczenia (w nawiasach podano wartości odchylenia standardowego)

Table 2. The change of mean dimensions of epidermal cells after different experimental treatment (standard deviation in brackets)

Etap doświadczenia Stage of experiment	Traktowanie Treatment	Szerokość komórek Cell width (μm)	Długość komórek Cell length (μm)
Przed rozpoczęciem kultury <i>in vitro</i> Before culture <i>in vitro</i>	Siewki nietraktowane Intact seedlings	16,1 ($\pm 3,61$)	143 ($\pm 46,00$)
po 2 h kultury <i>in vitro</i> cultured <i>in vitro</i> for 2 h	Odcinki bez IAA	16,4 ($\pm 2,85$)	148,9 ($\pm 43,98$)
	Odcinki z IAA	15,8 ($\pm 3,35$)	141,5 ($\pm 45,13$)
po 24 h kultury <i>in vitro</i> cultured <i>in vitro</i> for 24 h	Odcinki bez IAA	16,93 ($\pm 3,01$)	138,47 ($\pm 45,15$)
	Odcinki z IAA	16,13 ($\pm 3,20$)	148,95 ($\pm 53,08$)
po 72 h kultury <i>in vitro</i> cultured <i>in vitro</i> for 72 h	Odcinki bez IAA	17,2 ($\pm 3,11$)	156,11 ($\pm 52,21$)
	Odcinki z IAA	27,90 ($\pm 5,71$)	207,3 ($\pm 73,16$)
po 7 dniach kultury <i>in vitro</i> cultured <i>in vitro</i> for 7 days	Odcinki bez IAA	18,84 ($\pm 7,6$)	135 ($\pm 76,1$)
	Odcinki bez IAA, (końce bazalne)	31 ($\pm 7,2$)	72 ($\pm 22,3$)
	Odcinki z IAA	32 ($\pm 7,5$)	181 ($\pm 86,6$)
po 14 dniach kultury <i>in vitro</i> cultured <i>in vitro</i> for 14 days	Odcinki bez IAA	28 ($\pm 7,29$)	64 ($\pm 16,95$)
	Odcinki z IAA	36 ($\pm 12,29$)	195 ($\pm 57,39$)



Ryc. 3. Wzrost epidermy w kierunku podłużnym i obwodowym oraz zmiana długości komórek epidermy po 7 i 14 dniach hodowli *in vitro*. (Biały prostokąt symbolizuje fragment epidermy, żółty prostokąt – pojedynczą komórkę epidermy. Procenty zapisane pod każdym z wariantów wskazują o ile zmieniła się szerokość i długość epidermy w danym wariantcie doświadczenia względem szerokości S i długości D przed doświadczeniem; zmiana szerokości i długości komórek w danym wariantcie doświadczenia względem wymiarów początkowych s i d jest podana w procentach pod małymi prostokątami)

Fig. 3. Expansion of epidermis in longitudinal and circumferential direction and the change of dimensions of epidermal cells after 7 and 14 days in culture. (White rectangle represents a fragment of epidermis, small yellow rectangle represents a single cell. The change of the dimensions referred to the initial dimensions S and D before the experimental treatment is given in percents under the rectangles. The change of the dimensions of single cells referred to the initial dimensions s and d is given in percents under the small rectangles)

3. Wpływ auksyny na blaszki środkowe pomiędzy ścianami stycznymi

Wartość siły potrzebnej do odrywania paska tkanek zewnętrznych od reszty łodygi po różnym czasie traktowania auksyną podano w Tabeli 3. Po 3 godzinach od podania auksyny hipokotyle, na które podano auksynę i hipokotyle bez auksyny nie różniły się między sobą pod względem wartości tej siły i były porównywalne z hipokotylami przed doświadczeniem. Po 24 godzinach *in vitro* z egzogenną auksyną średnia wartość siły użytej do odrywania tkanek zewnętrznych była niższa od wartości siły użytej dla tkanek zewnętrznych odcinków bez auksyny. Sprawdzone czy podczas odrywania

fragmentu tkanki zrywanie połączeń ma miejsce w blaszkach środkowych, czy też rozrywane są ściany pierwotne. W tym celu obserwowano oderwany fragment tkanek zewnętrznych, zabarwiony kalkofluorem w mikroskopie fluorescencyjnym. Nie zaobserwowano rozrywanych ścian, co świadczy, że zrywanie połączeń między komórkami następuje w blaszce środkowej.

4. Układ mikrotubul w komórkach epidermy

W komórkach epidermy hipokotyli *in situ* (w materiale wyjściowym) obserwowano podłużny układ mikrotubul (równoległy do długiej osi) (Ryc. 4, Tab. 4). Podanie auksyny pro-

Tabela 3. Średnia wartość siły potrzebnej do oderwania od odcinka hipokotyli paska tkanek zewnętrznych o szerokości 1 mm w różnych wariantach doświadczenia

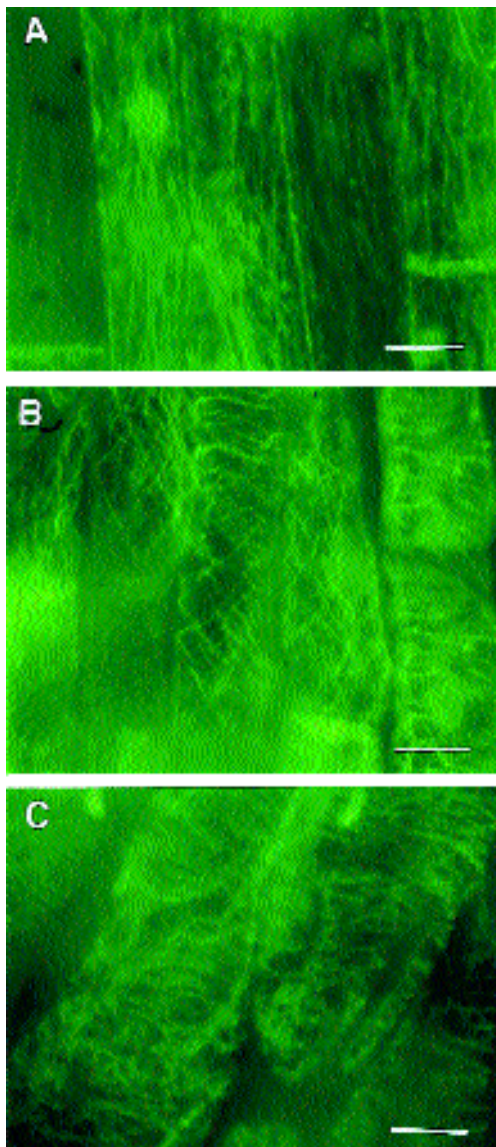
Table 3. Mean value of force necessary to peel off the strip of outer tissue from the hypocotyl after different experimental treatment

Sposób traktowania Experimental treatment	Etap doświadczenia Stage of experiment	Wartość siły potrzebnej do oderwania paska tkanek zewnętrznych [N / mm szerokości paska epidermy] Value of force necessary to peel off the strip of outer tissue [N / mm of width of epidermal strip]
Nietraktowane siewki Intact seedlings	Rozpoczęcie doświadczenia At the start of experiment	$11,94 \cdot 10^{-3}$
Odcinki bez egzogenego IAA Segments without exogenous IAA	3 h <i>in vitro</i>	$12,10 \cdot 10^{-3}$
	24 h <i>in vitro</i>	$11,75 \cdot 10^{-3}$
Odcinki z egzogennym IAA Segments with exogenous IAA	3 h <i>in vitro</i>	$11,96 \cdot 10^{-3}$
	24 h <i>in vitro</i>	$8,27 \cdot 10^{-3}$

Tabela 4. Częstość z komórek z podłużnym, ukośnym i poprzecznym układem mikrotubul w komórkach epidermy hipokotyli cynii *in situ*, w odcinku z egzogennym IAA i w odcinku bez egzogenego IAA

Table 4. Frequency of cells with longitudinal, inclined and transverse arrangement of microtubules in the epidermal cells of the hypocotyls of *Zinnia elegans in situ*, in sections supplied with exogenous auxin and in the sections without exogenous auxin

Przedziały kątów między mikrotubulami korowymi i długą osią komórki Range of angle between microtubules and long axis of a cell	Częstość komórek z wyróżnionym układem mikrotubul (% wszystkich komórek) Frequency of cells with distinguished arrangement of microtubules (% of total number of cells)						
	<i>In situ</i>	<i>In vitro</i> bez IAA <i>In vitro</i> without IAA			<i>In vitro</i> z IAA <i>In vitro</i> with IAA		
		0,5 h	1,5 h	24 h	0,5 h	1,5 h	24 h
0–30	100	100	100	61	100	5	2
31–60	0	0	0	36	0	57	30
61–90	0	0	0	3	0	38	68



Ryc. 4. Układ mikrotubul w epidermie hipokotyłu cynii pasek skali – 20 um. A. – *in situ*, B – po 1,5 h od podania IAA na odcinek hipokotyłu, C – po 24 h od podania IAA na odcinek hipokotyłu

Fig. 4. The arrangement of microtubules in epidermis of *Zinnia* hypocotyl; scale bar – 20 um. A – *in situ*, B – 1.5 h after application of IAA, C – 24 h after application of IAA

wadziło do stopniowej przebudowy podłużnej orientacji mikrotubul poprzez układ ukośny (po 1,5 h od podania auksyny) do układu poprzecznego. Po 24 godzinach hodowli w wariancie z egzogenną auksyną, w komórkach epidermy występował poprzeczny układ mikrotubul korowych. W komórkach epidermy odcinków bez egzogennej auksyny obserwowano układ podłużny, taki jak w epidermie *in situ*, zarówno po 0,5 h jak 1,5 h od rozpoczęcia doświadczenia. W wariantach bez auksyny po 24 godzinach w kulturze, w pobliżu końca bazalnego obserwowano układ ukośny i poprzeczny natomiast w części środkowej i przy końcu apikalnym – układ ukośny i podłużny.

Po 14 dniach w kulturze w eksplantatach z auksyną występował poprzeczny układ we wszystkich obserwowanych komórkach epidermy a w wariancie bez auksyny układ ukośny (przy czym na końcu bazalnym w tym wariancie mikrotubule ułożone były poprzecznie). Po 21 dniach hodowli *in vitro* w wielu komórkach zaszła depolimeryzacja mikrotubul i widoczne było słabe świecenie związane z fluorescencją tubuliny. W tych komórkach, które zachowały mikrotubule korowe były one poprzeczne, ale przeważały komórki, w których obserwowano bardzo rzadkie mikrotubule, nietworzące regularnego układu, lecz ułożone w różnych kierunkach.

DYSKUSJA

1. Zmiana właściwości ścian epidermy pod wpływem auksyny

Wiadomo, że wzrost komórek pod wpływem egzogennej podanej auksyny zachodzi wyłącznie, gdy w ścianie istnieje naprężenie rozciągające (Cleland 1967b; Cleland i Rayle 1972). Z prac Masudy i Yamamoto (1972) oraz Hejnowicza i Sieversa (1996a) wynika, że naprężenie wynikające z turgoru jest niewystarczające, aby zachodził wzrost: paski izolowanej epidermy w stanie turgoru nie wydłużają się w obecności auksyny, natomiast wydłużanie zachodzi dopiero, gdy przyłożą się do nich zewnętrzne naprężenia rozciągające. W epidermie turgorowo naprężonych pędów *in situ* silne naprężenie rozciągające w kierunku podłużnym, umożliwiające wzrost organu jest generowane endogenne (naprężenia tkankowe) i jest naturalną konsekwencją

zróznicowania strukturalnego pomiędzy tkankami (Hejnowicz i Sievers 1995a i b; 1996b).

Tymczasem z przedstawionych w niniejszej pracy doświadczeń wynika, że w odcinkach, na które podano egzogenną auksynę wzrost epidermy był bardzo intensywny, chociaż na skutek rozklejania komórek naprężenia tkankowe zostały całkowicie zniesione. Przypuszczalnie w długotrwałych doświadczeniach właściwości ścian komórkowych uległy na tyle znaczącej zmianie, że wzrost stał się możliwy pod wpływem naprężenia wynikającego wyłącznie z turgoru.

Można zastanowić się, jakie parametry określające wzrost komórek musiały ulec zmianie w długotrwałych doświadczeniach z auksyną, tak, że komórki pozbawione naprężeń tkankowych urosły? Wiadomo, że auksyna zmienia fizyczne parametry kontrolujące szybkość wzrostu, takie jak rozciągliwość ściany lub wartość progową turgoru. Z literatury wiadomo, że po pozbawieniu tkanki auksyny ulega obniżeniu rozciągliwość ściany komórkowej a wzrasta progowa wartość turgoru konieczna do wzrostu (Okamoto i in. 1989; Nakahori 1991; Maruyama i Boyer 1994). Z doświadczeń z egzogenną auksyną wynika, że rozciągliwość ścian wzrasta pod wpływem auksyny (Cleland 1967a; Cleland 1971). Co prawda nie wiadomo, jakie strukturalne elementy ściany należy wiązać z odpowiednimi modułami opisującymi właściwości wiskoelastyczne ściany, ale domyślnie przyjmuje się, że zmiana właściwości wiskoelastycznych ściany wywołana jest przez czynniki „rozluźniające” ścianę (Tomos i Pritchard 1994; Silva i in. 1994; Tominaga i in. 1999; McQueen-Mason 1995). Jednym z czynników regulujących właściwości ściany i wzrost komórek jest skład chemiczny pektyn (Kim i Carpita 1992). Wyniki badań Domingo i in. (1998) wskazują, że należy do nich zaliczyć odkrytą ostatnio liazę pektynianową. Z pracy tej wynika, że pod wpływem auksyny w komórkach mezofilu *Zinnia* dochodzi do indukcji liazy pektynianowej, enzymu degradującego pektyny, charakteryzującego się preferencyjnym rozrywaniem wiązania glikozydowego przy nieestryfikowanej grupie karboksylowej. Podłoża zawierające auksynę indukowały transkrypcję genu ZePel po 24 h. Pewnych pośrednich informacji wskazujących, że w hipo-

kotylach poddanych działaniu egzogennej auksyny zachodzi proces modyfikacji pektyn dostarczają pomiary siły potrzebnej do oderwania paska tkanek zewnętrznych z łodygi. Z tych pomiarów wynika, że siła ta spada po kilkunastu godzinach od podania IAA, natomiast w początkowym okresie od podania auksyny (3 h) jest porównywalna z siłą potrzebną do oderwania paska epidermy od hipokotyli niepoddanego doświadczeniu. Ponieważ zrywanie zachodzi w blaszkach środkowych zbudowanych prawie wyłącznie z pektyn, można sądzić, że spadek „lepkości” blaszek środkowych po 24 h od podania hormonu związany jest z syntezą enzymów degradujących pektyny. Można przypuszczać, że substratem dla tych enzymów są pektyny całej ściany komórkowej, a nie tylko blaszek środkowych, co w konsekwencji wpływa na mechaniczne właściwości ścian komórkowych.

2. Zróznicowanie wzrostu tkanek

W doświadczeniach przedstawionych w niniejszej pracy zaobserwowano, że komórki epidermy i kory pierwotnej odcinków hipokotyli, na które podano egzogenną auksynę podjęły wzrost, któremu nie towarzyszył równie intensywny wzrost tkanek wewnętrznych, co doprowadziło do fałdowania się epidermy i kory na powierzchni tkanek wewnętrznych. Istnienie zróznicowania we wzroście wywołanym przez auksynę pomiędzy tkankami wewnętrznymi i zewnętrznymi skłania do postawienia pytań: (i) dlaczego tkanki wewnętrzne nie „skorzystały” z rozluźnienia tkanek zewnętrznych i urosły znacznie słabiej oraz (ii) jakie może być komórkowe podłoże zróznicowanej reakcji tych tkanek na auksynę?

ad (i) Obserwacje anatomiczne dostarczają wskazówek, że słaby wzrost tkanek wewnętrznych może być związany z ich właściwościami mechanicznymi:

- 1) rdzeń jest otoczony przez tkanki przewodzące i nawet jeśli tkanka zewnętrzna przestaje ograniczać wzrost, to rolę usztywniającą pełni tkanka waskularna z naczyniami metaksylemu, o wzorze zgrubień ściany wtórnej uniemożliwiającym wydłużanie;
- 2) komórki tkanek wewnętrznych dzielą się, przez co stają się mniejsze, a to z kolei obniża turgorowe naprężenie ściany i hamuje wzrost.

ad (ii) Odmienna reakcja tkanek wewnętrznych i zewnętrznych na auksynę (wzrost tkanek zewnętrznych i podziały w tkankach wewnętrznych) może być wynikiem bądź (1) zróżnicowanego rozmieszczenia receptorów auksyny bądź (2) odmiennego wzoru ekspresji genów w odpowiedzi na ten sam bodziec hormonalny.

(Ad. 1) powszechnie przyjmuje się, że receptorami auksyny są ABP1 (*ang.* auxin binding protein 1), które uczestniczą w regulacji procesu wzrostu wydłużeniowego (Jones i in. 1998). W literaturze opisano, że epiderma jest bardziej bogata w te receptory niż tkanki wewnętrzne (Löbner i Klämbt 1985), choć u innego obiektu takiego zróżnicowania nie ma (Hesse i in. 1993, Schwob i in. 1993).

(Ad. 2) pod wpływem auksyny w cytoplazmie pojawia się wiele różnych mRNA, których występowanie jest ściśle skorelowane z wydłużaniem; równocześnie ekspresja tych genów znacząco się różni w komórkach tkanek zewnętrznych i tkanek wewnętrznych. Do grupy produktów ekspresji genetycznej specyficznych dla stymulacji auksynowej należą mRNA grupy SAUR (z *ang.* small up regulated RNAs) (Napier i Venis 1995; Franco i in. 1990; McClure i Guilfoyle 1989). Inne produkty ekspresji genetycznej specyficzne dla komórek reagujących na auksynę wydłużaniem to czynniki transkrypcyjne (Napier i Venis 1995). Odmienność tkanek zewnętrznych i wewnętrznych widoczna jest także w zróżnicowanej ekspresji genów H+ATPazy w odpowiedzi na auksynę (Frias i in. 1996, Hager i in. 1991).

Nie wiemy ani jak rozmieszczone są receptory auksyny u cynii, ani jaki jest wzór ekspresji genetycznej, można jednak przypuszczać, że bardzo silna reakcja wzrostowa komórek kory i epidermy w przypadku długotrwałej hodowli *in vitro* z auksyną jest wynikiem stałej, wzmożonej ekspresji genów związanych z wydłużaniem w tych tkankach.

Podczas gdy tkanki zewnętrzne reagowały na auksynę wzrostem, tkanki wewnętrzne (perycykl i miękisz międzywiązkowy) podjęły intensywne podziały. Podobne „rozmieszczenie” podziałów, prowadzące do powstania proembriogenicznej masy komórek z perycyklu i tkanek naczyniowych hipokotyłu marchwi opisali Guzzo i in. (1994). Podobnie jak w przypadku zróżnicowanej tkankowo ekspresji genów związanych z wydłużaniem wywołanej auksy-

ną, istnieje zróżnicowanie dotyczące ekspresji genetycznej tkanek dzielących się i niedzieliących się (Van der Zaal i in. 1991; Napier i Venis 1995).

3. Kierunki wzrostu komórek epidermy w hodowli *in vitro*

Dobrze udokumentowane jest, że auksyna stymuluje wydłużanie zarówno odcinków łodyg jak i łodyg nienaruszonych roślin. Nie oznacza to bynajmniej, że blokuje inne kierunki wzrostu (Czaja 1935; Shibaoka 1991).

Z badań prezentowanych w niniejszej pracy wynika, że epiderma odcinków łodyg, na które podano auksynę rosła zarówno na długość jak i na szerokość. Wzrost odcinków, na które nie podano egzogennej auksyny zachodził przede wszystkim w kierunku poprzecznym. Na pytanie, dlaczego pojawiło się zróżnicowanie kierunków wzrostu komórek z auksyną i bez auksyny dostarcza odpowiedzi analiza układu mikrotubul korowych. Auksyna powoduje zmianę orientacji mikrotubul korowych w epidermie z podłużnej na poprzeczną po półtorej godzinie od podania auksyny (mikrotubule w większości komórek przybierają ułożenie ukośne lub poprzeczne). Dłuższy czas reakcji na auksynę niż opisany przez innych autorów (Nick i in. 1990, Bergfeld i in. 1988) może wynikać z odmiennego sposobu podania auksyny. Zgodnie z hipotezą Greena (1980) orientacja mikrotubul korowych decyduje o orientacji mikrofibryli celulozy, co z kolei decyduje o anizotropii modułów Younga ściany i tym samym o kierunku wzrostu. Przy podłużnym układzie mikrotubul, obserwowanym w epidermie odcinków bez egzogennej auksyny, preferowanym kierunkiem wzrostu był kierunek poprzeczny. Mikrotubule epidermy odcinków hipokotyłu, na które nie podano egzogennej auksyny zachowały układ podłużny, taki jak w epidermie *in situ*. Ponieważ kierunek wzrostu komórek zależy przede wszystkim od orientacji mikrofibryli celulozy, łatwo można zrozumieć poprzeczny wzrost komórek, w których występuje podłużny układ mikrotubul. Można też dostrzec anatomiczny „sens” takiego układu w strefie hipokotyłu, która zakończyła wydłużanie. W komórkach epidermy hipokotyli *in situ*, w strefie, która zakończyła wydłużanie podłużnie zorientowane mikrofibryle celulozy ograniczają wzrost wydłużeniowy. Taki układ mikrofibryli sprzyja nato-

miast wzrostowi na szerokość podczas późniejszego grubienia łodyg. W odcinkach łodyg hodowanych *in vitro* bez egzogennej auxyny układ mikrotubul nie ulega zmianie i przez pierwszych kilka dni jest taki, jak w komórkach *in situ*; w tej sytuacji nieznaczne rozluźnienie ściany spowodowane warunkami hodowli *in vitro* prowadzi do wzrostu w kierunku poprzecznym. Nieco bardziej złożona zależność między orientacją mikrotubul a kierunkami wzrostu komórek epidermy występowała w odcinkach, na które podano egzogenną auxynę:

(i) wzrost poprzeczny nie zakończył się z chwilą przeorganizowania układu mikrotubul na poprzeczny,

(ii) nieoczekiwanie, komórki epidermy, w których pod wpływem auxyny zaszło przeorganizowanie układu mikrotubul z podłużnego na poprzeczny już w pierwszych godzinach po podaniu hormonu rosły prawie izotropowo przez kolejnych kilka dni hodowli.

Z naszych doświadczeń wynika, że pomimo poprzecznego i ukośnego układu mikrotubul (i tym samym mikrofibryli celulozy) wzrost w pierwszych dniach (3 dni od podania hormonu) zachodził przede wszystkim w kierunku poprzecznym, co musiało wiązać się z podłużną orientacją mikrofibryli w warstwach ściany odłożonych przed rozpoczęciem doświadczenia. Rozluźnienie ściany powodowało najpierw wzrost poprzeczny (jako konsekwencję początkowego układu podłużnego mikrofibryli). Po kilku dniach, na skutek odłożenia nowych mikrofibryli celulozy w kierunku poprzecznym moduł Younga dla kierunku poprzecznego zrównał się z modułem dla kierunku podłużnego i wzrost, pomimo poprzecznej orientacji mikrofibryli w nowej warstwie ściany, był izotropowy.

SUMMARY

Exogenous auxin supplied to *Zinnia elegans* L. hypocotyl segments induces different answer of cells of epidermis and primary cortex, which intensively enlarge, and of cells of vascular system and pith parenchyma, which intensively divide. In outer tissues after application of auxin, the middle lamellas are lysed and cells start to separate. Separation of cells starts with the separation of the tangential walls and then the process occur in the radial walls, the trans-

verse walls separate at last. In hypocotyl sections cultured *in vitro* and supplied with exogenous auxin growth of epidermis is almost isotropic, whereas without exogenous auxin growth is mainly transverse.

LITERATURA

- Ballas N. Wong L.M., Theologis A.** 1993, Identification of the auxin responsive element, AuxRE, in the primary indoleacetic acid – inducible gene, *ps-iaa4-5*, of pea (*Pisum sativum*). Journal of Molecular Biology 233: 580-59.
- Bergfeld R., Speth V., Schopfer P.** 1988, Reorientation of microtubules at the outer epidermal wall of maize coleoptiles during auxin mediated growth. Botanica Acta 101: 57-67.
- Brete-Harte M.S., Baskin T.I., Green P.B.** 1991, Auxin stimulates both deposition and breakdown of material in the pea outer epidermal cell wall, as measured interferometrically. Planta 185: 462-471.
- Brett C., Waldron K.W.** 1996, Physiology and biochemistry of plant cell wall. Chapman and Hall.
- Stolle-Smith T. Beekhuizen J.G., Kok M.T.C., Pijnenburg M., Recourt K., Derksen J., Voragen A.G.J.** 1999, Changes of cell wall polysaccharides of green bean pods during development. Plant Physiology 121: 363-372.
- Brummell D.A., Hall A.** 1987, Rapid cellular responses to auxin and the regulation of growth. Plant Cell and Environment 10: 523-543.
- Cleland R.** 1967a, Extensibility of isolated cell walls: Measurement and changes during cell elongation. Planta 74: 197-209.
- Cleland R.** 1967b, A dual role of turgor pressure in auxin-induced cell elongation in *Avena* coleoptiles. Planta 77: 182-191.
- Cleland R.** 1971, The mechanical behavior of isolated *Avena* coleoptile walls subjected to constant stress. Properties and relation to cell elongation. Plant Physiology 47: 805-811.
- Cleland R., Rayle D.L.** 1972, Absence of auxin-induced stored growth in *Avena* coleoptiles and its implication concerning the mechanism of wall extension. Planta 106: 61-71.
- Cosgrove D.J.** 1987, Linkage of wall extension with water and solute uptake. W: Physiology of cell expansion during plant growth. Wyd. D.J. Cosgrove i D.P. Knievel, The American Society of Plant Physiologists, pp: 88-100.

- Czaja A.T.** 1935, Polarität und Wuchstoff. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft 53: 197-220.
- Domingo C., Roberts K., Stacey N.J., Conner-ton I., Ruiz-Terran F., Mc Cann M.C.** 1998, A pectate lyase from *Zinnia elegans* is auxin inducible. The Plant Journal 13: 17-28.
- Edelman H., Schopfer P.** 1989, Role of protein and RNA synthesis in the initiation of auxin-induced growth in coleoptiles of *Zea mays* L. Planta 179: 475-485.
- Franco A.R., Gee M.A., Guilfoyle T.J.** 1990, Induction and superinduction of auxin-responsive mRNAs with auxin and protein synthesis inhibitors. Journal of Biological Chemistry 265: 15845-15849.
- Frias I., Caldira M.T., Perez-Castineira J.R., Navarro-Avino J.P., Culinez-Macia F.A., Kuppinger O., Stransky H., Pages M., Hager A., Serrano R.** 1996, A major isoform of the maize plasma membrane H⁺ATPase: characterisation and induction by auxin in coleoptiles. The Plant Cell 8: 1533-1544.
- Green P.B.** 1980, Organogenesis – a biophysical view. Annual Review of Plant Physiology 31: 51-82.
- Guzzo M., Baldan B., Mariani P., Lo Schiavo F., Terzi M.** 1994, Studies on the origin of totipotent cells in explants of *Daucus carota* L. Journal of Experimental Botany 45 (279): 1427-1432.
- Hager A., Debus G., Edel H.G., Stransky H., Serrano R.** 1991, Auxin induced exocytosis and the rapid synthesis of a high turnover pool of plasma membrane H⁺ATPase. Planta 185: 527-537.
- Hawkins S., Boudet A.** 1996, Wound-induced lignin and suberin deposition in a woody angiosperm (*Eucalyptus gunii* Hook): histochemistry of early changes in young plants. Protoplasma 191: 96-104.
- Hejnowicz Z., Sievers A.** 1995a, Tissue stresses in organs of herbaceous plants I. Poisson ratios of tissues and their role in determination of the stresses. Journal of Experimental Botany 46: 1035-1043.
- Hejnowicz Z., Sievers A.** 1995b, Tissue stresses in organs of herbaceous plants II. Determination in three dimensions in the hypocotyl of sunflower. Journal of Experimental Botany 46: 1045-1053.
- Hejnowicz Z., Sievers A.** 1996, Acid-induced elongation of *Reynoutria* stems requires tissue stresses. Physiologia Plantarum 98: 345-348.
- Hejnowicz Z., Rusin A., Rusin T.** 2000, Tensile tissue stress affects the orientation of cortical microtubules in the epidermis of sunflower hypocotyl. Journal of Plant Growth Regulators 19: 31-44.
- Hesse T., Garbers C., Brzobohaty B., Kreimer G., Soll D., Melkonian M., Schell J., Palme K.** 1993, Two members of ERabp gene family are expressed differentially in reproductive organs but to similar levels in the coleoptile of maize. Plant Molecular Biology 23: 57-66.
- Jones A.M., Im Kyung-Hoam, Savka M.A., Wu Ming-Jing, DeWitt N.G., Shilito R., Binns A.N.** 1998, Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-binding protein1. Science 282: 1114-1117.
- Kim J.B., Carpita N.C.** 1992, Changes in esterification of the uronic acid groups of cell wall polysaccharides during elongation of maize coleoptiles. Plant Physiology 98: 646-653.
- Kutschera U.** 1991, Regulation of cell expansion. In: The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form. Wyd. C.W. Lloyd, Academic Press Ltd. Str. 149-158.
- Kutschera U.** 1987, Cooperation between outer and inner tissues in auxin-mediated plant organ growth. W: Physiology of Cell Expansion During Plant Growth. Wyd. Cosgrove, D.J., Knivel D.P., The American Society of Plant Physiologists, Rockville. Str. 215-226.
- Löbner M., Klämbt D.** 1985, Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn. (*Zea mays* L.) II Localization of a putative auxin receptor. Journal of Biological Sciences. 260: 9854-9859.
- Lockhardt J.A.** 1965, An analysis of irreversible plant cell elongation. Journal of Theoretical Biology 8: 264-275.
- Maruyama S., Boyer J.S.** 1994, Auxin action on growth in intact plants: Threshold turgor is regulated. Planta 193: 44-50.
- Masuda Y., Yamamoto R.** 1972, Control of auxin-induced stem elongation by the epidermis. Physiologia Plantarum 27: 109-115.
- McCann M.C., Roberts K.** 1994, Changes in cell wall architecture during cell elongation. Journal of Experimental Botany 45: 1683-1691.

- McClure B.A., Guilfoyle T.** 1989, Rapid redistribution of auxin regulated RNAs during gravitropism. *Science* 243: 91-93.
- McQueen-Mason S.J.** 1995, Expansins and cell wall expansion. *Journal of Experimental Botany* 46: 1639-1650.
- McQueen-Mason S.J., Cosgrove D.J.** 1994, Disruption of hydrogen bonding between wall polymers by proteins that induce plant wall extension. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 91: 6574-6578.
- McQueen-Mason S.J., Cosgrove D.J.** 1995, Expansin mode of action on the cell walls: analysis of wall hydrolysis, stress relaxation and binding. *Plant Physiology* 107: 87-100.
- Murashige T., Skoog F.** 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nakahori K., Katou K., Okamoto H.** 1991, Auxin changes both extensibility and the yield threshold of the cell wall of *Vigna* hypocotyls. *Plant Cell Physiology* 32: 121-129.
- Napier R.M., Venis M.A.** 1995, Auxin action and auxin-binding proteins. *New Phytologist* 129: 167-201.
- Nick P., Bergfeld R., Schafer E., Schopfer P.** 1990, Unilateral reorientation of microtubules at the outer epidermal wall during photo- and gravitropic curvature of maize coleoptiles and sunflower hypocotyls. *Planta* 181: 162-168.
- Niklas K.J., Paolillo D. Jr** 1999, The role of the epidermis as a stiffening agent in tulipa (*Liliaceae*) stems. *American Journal of Botany* 84: 735-744.
- Okamoto H., Liu Q., Nakahori K., Katou K.** 1989, A pressure jump method as a new tool in growth physiology for monitoring physiological wall extensibility and effective turgor. *Plant Cell Physiology* 30: 979-985.
- Pope D.G.** 1993, Evidence for two indole-3-acetic acid induced growth responses in the *Avena* straight-growth indoleacetic acid assay. *Plant Physiology* 102: 409-415.
- Rusin A.** 2000, Układy elementów trachealnych i wydłużonych komórek miękiszowych *Zinnia elegans* w kulturach in vitro. Praca doktorska. Uniwersytet Śląski, Katowice.
- Schwob E., Choi S-Y, Simmons C., Migliaccio F., Ilag L., Hesse T., Palme K., Söhl D.** 1993, Molecular analysis of three maize 22kDa auxin-binding protein genes – transient promoter expression and regulatory regions. *The Plant Journal* 4: 423-432.
- Shibaoka H.** 1991, Microtubules and the regulation of cell morphogenesis by plant hormone. W: *The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form*. Wyd. C.W. Lloyd, Academic Press Ltd. Str. 159-168.
- Shibaoka H.** 1994, Plant hormone-induced changes in the orientation of cortical microtubules: alterations in the cross-linking between microtubules and the plasma membrane. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology Series* 45: 527-544.
- Silva J., Arrowsmith D., Hallyer A., Whiteman S., Robinson S.** 1994, Xyloglucan endotransglycosylase and plant growth. *Journal of Experimental Botany* 45: 1693-1701.
- Theologis A.** 1986, Rapid gene regulation by auxin. *Annual Review of Plant Physiology* 37: 407-438.
- Tominaga R., Samejima M., Sakai F., Hayashi T.** 1999, Occurrence of cello-oligosaccharides in the apoplast of auxin-treated pea stems. *Plant Physiology* 119: 249-254.
- Tomos D., Pritchard J.** 1994, Biophysical and biochemical control of cell expansion in root and leaves. *Journal of Experimental Botany* 45: 1721-1731.
- Van der Zaal E.J., Droog F.N.J., Boot C.J.M., Hensgens L.A.M., Hoge J.H.C., Schlperoort R.A., Libbenga K.R.** 1991, Promoters of auxin induced genes from tobacco can lead to auxin-inducible and root-tip specific expression. *Plant Molecular Biology* 16: 933-998.
- Yang T., Law D.M., Davies P.J.** 1993, Magnitude and kinetics of stem elongation induced by exogenous indole-3-acetic acid in intact light-grown seedlings. *Plant Physiology* 102: 717-724.