

JOANNA KOPCIŃSKA

UDZIAŁ HORMONÓW ROŚLINNYCH W RÓŻNICOWANIU ELEMENTÓW DREWNA W KULTURACH *IN VITRO*

Metoda badania czynników regulacji morfogenezy roślin przy zastosowaniu kultur tkankowych, mimo poważnych ograniczeń wynikających z izolacji kompleksu komórkowego z naturalnego środowiska biofizycznego, pozwala jednak na uzyskanie wielu cennych informacji dzięki możliwości ścisłej kontroli składu chemicznego pożywki. Toteż jest wykorzystywana chętnie przez wielu badaczy morfogenezy roślin. Szczególnie często stosowanym systemem modelowym do badań nad mechanizmem regulacji różnicowania komórek roślinnych jest proces ksylogenezy. W toku różnicowania elementów trachealnych dają się bowiem wyróżnić wyraźne stadia rozwojowe: kierunkowy wzrost komórki, odkładanie (według określonego wzoru) wtórnej ściany komórkowej, autoliza protoplastu. Możliwość stosunkowo precyzyjnego określenia każdej z tych faz, oraz łatwość śledzenia przebiegu procesu ogólnie dostępnymi metodami (mikroskopia świetlna, proste barwienia) zadecydowały o jego przydatności w badaniu cytodyferencjacji.

Doświadczenia nad indukcją ksylogenezy w kulturach tkankowych *in vitro* prowadzone na kallusie *Pisum* i *Convolvulus* (Torrey 1968), soi (Torrey 1968; Fosket, Torrey 1969), topinambura (Minchoa, Halperin 1974), na wycinkach korzeni grochu (Torrey, Fosket 1970; Philips, Torrey 1973), na fragmentach rdzenia sałaty (Dalessandro 1973a), oraz obserwacje regeneracji tkanki naczyniowej w zranionych międzywęzłach różnych roślin wskazują, że koniecznym warunkiem do wywołania obu tych procesów jest obecność w pożywce auksyny i cytokininy. Podanie do pożywki tylko jednego z tych hormonów nie stymuluje w badanych tkankach ksylogenezy. Natomiast indukcję ksylogenezy przy udziale wyłącznie auksyny kwasu indolilo-3-owego (IAA) wykazano u *Coleus* (Fosket, Roberts 1964; Earle 1968), oraz w kulturach tkankowych z bulw topinambura (Dalessandro 1973b). W obu przypadkach dodanie do pożywki cytokininy nie wpływało na ksylogenezę lub powodowało hamowanie tego procesu. Wydaje się, że badane tkanki tych roślin są zdolne do produkcji endogennej cytokininy w ilości wystarczającej do zapoczątkowania różnicowania

elementów trachealnych. Dlaczego jednak podanie cytokininy egzogennej może wywołać nawet efekt hamowania, nie wiadomo.

Duże zainteresowanie budzi ksylogenne działanie syntetycznej auksyny kwasu 2,4-dwuchlorofenoksyoctowego (2,4-D). Witham (1968) a także Dalessandro i Roberts (1971) donoszą o stymulacji ksylogenezy w tkance kallusowej soi, tytoniu i w rdzeniu sałaty pod wpływem 2,4-D i bez udziału egzogennych cytokinin. Witham (1968) sugeruje, że 2,4-D jest auksyną i jednocześnie wykazuje własności słabej cytokininy, bądź stymuluje tkankę do produkcji własnej cytokininy.

Nie ulega wątpliwości, że wzrost komórki obserwowany w pierwszej fazie różnicowania się elementów trachealnych jest pod bezpośrednią kontrolą auksyny, natomiast proces lignifikacji wtórnej ściany komórkowej prawdopodobnie zależy od stosunku stężenia auksyny do cytokininy w pożywce. Wetmore i Rier (1963) stwierdzili, że ksylogenne działanie tych hormonów jest modyfikowane przez sacharozę. Ogólny schemat doświadczenia był następujący: na powierzchni wycinków tkanki kallusowej *Syringa vulgaris* L. umieszczali kostkę agarową zawierającą IAA i sacharozę w różnych stężeniach. Pierwszym dającym zaobserwować się efektem było powstawanie w tkance kallusowej grup komórek ułożonych w regularny pierścień i charakteryzujących się intensywnymi podziałami mitotycznymi. W tych właśnie grupach komórek następowało różnicowanie tkanki waskularnej, a sposób różnicowania zależał od stosunku stężeń IAA i sacharozy. Przy stałej koncentracji IAA i stężeniu sacharozy równym 1% tworzyło się bardzo niewiele elementów trachealnych; 1—2% stężenie sacharozy sprzyjało intensywnej ksylogenezie. Elementy zarówno ksylemu jak i floemu, często oddzielone od siebie warstwą komórek przypominających kambium, obserwowano przy stężeniu sacharozy 2,5—3,5%. Podniesienie koncentracji sacharozy do 4% i powyżej stymulowało różnicowanie floemu, elementy ksylemu pojawiały się rzadko lub nie występowały w ogóle. Zachowanie stałego stężenia sacharozy przy jednoczesnym wzroście stężenia auksyny dawało możliwość regulacji średnicy pierścienia utworzonego przez grupy różnicujących się komórek.

Próby wyjaśnienia modyfikującego działania sacharozy nie mogą ograniczać się tylko do traktowania tej substancji jako źródła energii potrzebnej do przebiegu procesu różnicowania, lub źródła węglowodanów niezbędnych dla budowy wtórnej ściany komórkowej; wydaje się, że gradientowe pole stężenia sacharozy może zmieniać działanie auksyny (Wetmore, DeMaggio, Rier 1964).

Jak wiadomo auksyna jest jedynym hormonem roślinnym, który transportowany jest polarnie. W pędach aktywny transport zachodzi zawsze od końca fizjologicznie górnego (apikalnego) do końca fizjologicznie dolnego (bazalnego). Jest to tzw. transport bazypetalny. Pewne dane przemawiają za tym, że ksylogenne działanie auksyny jest ściśle związane z jej polarnym transportem. Wskazują na to wyniki doświadczeń nad regeneracją tkanki waskularnej zranionych, izolowanych międzywęzli roślin. Na międzywęzła *Hibiscus esculentus* L., *Pisum sativum* L. i *Arachis hypogea* L. podawano na koniec bazalny lub apikalny auksyny IAA i 2,4-D (Thompson 1970). Reakcję ksylogenną wywoływała jedynie auksyna podana na koniec apikalny. Podobne rezultaty uzyskano dla tytoniu (Sheldrake, Northcote 1968), dla *Coleus*

i pomidora (Thompson, Jacobs 1966; Thompson 1968). Problem wpływu auksyny na proces różnicowania komórek w aspekcie polarnego transportu hormonu nie jest dostatecznie zbadany, chociaż ostatnio pojawiły się nowe koncepcje w tym zakresie. Zajączkowski i Wodzicki (1978) zaproponowali teoretyczny model hormonalnej regulacji morfogenezy roślin w oparciu o oscylacyjno-falowy charakter transportu auksyny. Model ten pozwala na wyjaśnienie, w jaki sposób zjawiska oscylacyjno-falowe pozostające w związku z polarnym transportem auksyny mogą być odpowiedzialne za regulację różnicowania komórek roślinnych. Brak jest jednak porównawczych danych na temat cytodyferencjacji w wycinkach z rdzenia zbudowanego z jednorodnej tkanki parenchymatycznej w zależności od długości wycinka i wieku izolowanej tkanki. Forest i McCully (1971) wskazują na występowanie polarnego transportu auksyny w rdzeniu tytoniu, według Shelldrake'a (1973) bazypetalny transport auksyny odbywa się poprzez kambium i najmłodsze pochodne, natomiast udział parenchymatycznego rdzenia w przemieszczaniu hormonu jest nieznaczny i maleje wraz z wiekiem tkanki. W kulturach kallusowych, które pod względem stopnia zróżnicowania przypominają rdzeń pędu, Wetmore i Rier (1963) nie stwierdzają polarności w żadnym kierunku i sugerują, że przemieszczanie auksyny odbywa się tylko na zasadzie dyfuzji.

Interesujące obserwacje dotyczące wpływu różnych auksyn i cytokinin na sposób ułożenia elementów trachealnych, poczynili Dalessandro i Roberts (1971). W wycinkach rdzenia sałaty hodowanych na pożywce agarowej otrzymywali różny wzór ksylogenezy w zależności od stosowanych hormonów. IAA + cytokininy powodowały powstanie w brzeżnej części wycinka zamkniętego pierścienia, zbudowanego z szeregów cewek zorientowanych pionowo do podłoża. W dolnej części wycinka kontaktującej się bezpośrednio z pożywką, obserwowali istotne różnice w sposobie ksylogenezy między kombinacjami IAA i różnymi cytokininami. IAA + zeatina stymulowały powstawanie anastomotycznych połączeń między pionowymi szeregami; IAA + kinetyna indukowały wytworzenie izolowanych grup cewek rozmieszczonych przypadkowo; benzyladenina wraz z IAA dawały podobny efekt, ale formowała się mniejsza ilość cewek. Zastosowanie kwasu naftaleno-1-octowego (NAA) w połączeniu z cytokininami powodowało powstawanie rozgałęzionych, promieniście zorientowanych szeregów cewek. Z czego wynika różny wzór ułożenia elementów trachealnych przy podaniu IAA i NAA i w jaki sposób cytokininy modyfikują działanie auksyny to pytania, na które nie potrafimy dać jeszcze odpowiedzi.

Badania nad rolą i udziałem cytokinin w procesie różnicowania komórek roślinnych w kulturach *in vitro* są trudne ze względu na to, że większość tkanek i organów roślin wyższych zawiera znaczny poziom tych substancji. Wiele danych wskazuje na to, że rola cytokinin w procesie ksylogenezy polega na stymulacji podziałów komórkowych. Cytokininy indukują podziały mitotyczne komórek i dopiero pochodne wstępują na drogę różnicowania (Fosket, Torrey 1969; Torrey, Fosket 1970; Philips, Torrey 1973). Czy pojedyncza izolowana komórka może podlegać różnicowaniu? Torrey (1975) podaje, że udało się tego dokonać dla kallusa *Centaurea*, podkreśla jednak, że są to przypadki sporadyczne. Wydaje się być logicznym

fakt różnicowania komórek w pewnym zespole, ponadkomórkowym systemie, wtedy bowiem dopiero specjalizacja nabiera biologicznego sensu.

Odrębne zagadnienie stanowi ksylogeneza a poliploidalność komórek. Torrey, Fosket (1970); Philips, Torrey (1973); Libbenga, Torrey (1973) sugerują dla *Pisum sativum* L. następującą sekwencję zdarzeń: cytokininy powodują endoreduplikację, komórki poliploidalne podlegają podziałom mitotycznym i w fazie G₁ cyklu komórkowego następuje proces różnicowania. Tak więc, według tych autorów, komórki poliploidalne są bardziej predysponowane do różnicowania niż komórki diploidalne. Odmienne wyniki uzyskali Wright i Northcote (1973) dla *Acer pseudoplatanus* L. Jedynie komórki diploidalne podlegały dyferencjacji, w hodowlach komórek tetraploidalnych nie obserwowali tego zjawiska.

Gibereliny stanowią grupę hormonów bardzo słabo zbadaną pod kątem ich udziału w ksylogenezie *in vitro*. Z dotychczas uzyskanych wyników można sądzić, że nie są zdolne do zaindukowania procesu różnicowania przy braku w pożywce auksyny i cytokininy. W świetle koncepcji o ścisłym związku, w jakim pozostają w stosunku do siebie układ mikrotubul w cytoplazmie i układ mikrofibrylli celulozowych ściany komórkowej, wydaje się być prawdopodobne, że gibereliny zmieniając orientację mikrotubul mają wpływ na sposób odkładania wtórnej ściany komórkowej (Shibaoka 1974 wg Robertsa). Pośredni efekt giberelin na ksylogenezę obejmuje indukcję aktywności hydrolaz, co może powodować tworzenie monomerów cukrowych niezbędnych do syntezy ściany komórkowej. Ta dziedzina działania giberelin wymaga dalszych intensywnych badań (Kaufman, Ghosheh, LaCroix, Soni, Ikuma 1973; Broughton, McComb 1971; Varner 1964, 1967).

Niewiele również wiemy o roli, jaką odgrywa, w regulacji różnicowania komórek roślinnych naturalny inhibitor roślin kwas abscyzynowy (ABA). Minchoa i Halperin (1974) obserwowali zahamowanie różnicowania elementów trachealnych w tkance z bulw topinambura po dodaniu do pożywki ABA. Być może jest to związane z blokowaniem przez ABA metabolizmu kwasów nukleinowych co sugeruje Bex (1972).

Opracowany przez Zajączkowskiego i Wodzickiego (1978) teoretyczny model hormonalnej regulacji morfogenezy roślin daje możliwość prowadzenia szeregu dalszych doświadczeń, które mogą stanowić przyczynek do wyjaśnienia procesu różnicowania komórek roślinnych. Jeśli zjawiska oscylacyjno-falowe towarzyszące polarnemu transportowi auksyny stanowią źródło informacji rozpoznawanej przez komórkę i w ten sposób mogą być związane z różnicowaniem komórek, to rolę innych regulatorów ksylogenezy należy rozpatrywać w aspekcie ich modyfikującego działania na transport auksyny. Być może, obserwowany przez Dalessandro i Robertsa (1971), różny układ elementów trachealnych w zależności od rodzaju stosowanej cytokininy da się wyjaśnić odmiennym działaniem każdej z nich na przemieszczanie IAA, a różnice we wzorze ksylogenezy przy podaniu w pożywce IAA i NAA, innymi parametrami fali tych hormonów. Można się spodziewać, że zastosowanie jakichkolwiek czynników zakłócających w określony sposób przebieg fali auksyny (przeszkody mechaniczne, pole magnetyczne) stworzy możliwość ścisłej kontroli wzoru ksylogenezy.

LITERATURA

- Bex, J. H. M., 1972. Effects of abscisic acid on nucleic acid metabolism in maize coleoptiles. *Planta* 103: 1—10.
- Broughton, W. J., McComb, A. J., 1971. Changes in the pattern of enzyme development in gibberellin-treated pea internodes. *Ann. Bot.* 35: 213—28.
- Dalessandro, G., 1973a. Hormonal control of xylogenesis in pith parenchyma explants of *Lactuca*. *Ann. Bot.* 37: 375—82.
- Dalessandro, G., 1973b. Interaction of auxin, cytokinin and gibberellin on cell division and xylem formation in cultured explants of Jerusalem artichoke. *Plant Cell Physiol.* 4: 1167—76.
- Dalessandro, G., Roberts, L. W., 1971. Induction of xylogenesis in pith parenchyma explants of *Lactuca*. *Am. J. Bot.* 58: 378—85.
- Earle, E. D., 1968. Induction of xylem elements in isolated *Coleus* pith. *Am. J. Bot.* 55: 302—5.
- Forest, J. C., McCully, M. E., 1971. Histological study on the *in vitro* induction of vascularization in tobacco pith parenchyma. *Can. J. Bot.* 49: 449—52.
- Fosket, D. E., Roberts, L. W., 1964. Induction of wound-xylem differentiation in isolated *Coleus* stem segments *in vitro*. *Am. J. Bot.* 51: 19—25.
- Fosket, D. E., Torrey, J. G., 1969. Hormonal control of cell proliferation and xylem differentiation in cultured tissues of *Glycine max* var. Biloxi. *Plant Physiol.* 44: 871—80.
- Kaufman, P. B., Ghosheh, N. S., LaCroix, J. D., Soni, S. L., Ikuma, H., 1973. Regulation of invertase levels in *Avena* stem segments by gibberellic acid, sucrose, glucose, and fructose. *Plant Physiol.* 52: 221—8.
- Libbenga, K. R., Torrey, J. G., 1973. Hormone-induced endoreduplication prior to mitosis in cultured pea root cortex cells. *Am. J. Bot.* 60: 293—9.
- Minchoa, S. C., Halperin, W., 1974. Hormones and metabolites which control tracheid differentiation, with or without concomitant effects on growth, in cultured tuber tissue of *Helianthus tuberosus* L. *Planta* 116: 319—31.
- Philips, R., Torrey, J. G., 1973. DNA synthesis, cell division and specific cytodifferentiation in cultured pea root cortical explants. *Develop. Biol.* 31: 336—47.
- Sheldrake, A. R., 1973. Auxin transport in secondary tissues. *J. Exp. Bot.* 24: 87—96.
- Sheldrake, A. R., Northcote, D. H., 1968. The production of auxin by tobacco internode tissues. *New Phytol.* 67: 1—13.
- Shibaoka, H., 1974. Involvement of wall microtubules in gibberellin promotion and kinetin inhibition of stem elongation. *Plant Cell Physiol.* 15: 225—63. (Praca nie czytana w oryginale, wg Robertsza 1976).
- Thompson, N. P., 1968. Polarity of IAA-¹⁴C and 2,4-D-¹⁴C transport and vascular regeneration in isolated internodes of peanut. In: *Biochemistry and physiology of plant growth substances*. Ed. F. Wightman and G. Setterfield, Runge Press, Ottawa, pp: 1205—13.
- Thompson, N. P., 1970. The transport of auxin and regeneration of xylem in okra and pea stems. *Am. J. Bot.* 57: 390—8.
- Thompson, N. P., Jacobs, W. P., 1966. Polarity of IAA effect on sieve-tube xylem regeneration in *Coleus* and tomato stems. *Plant Physiol.* 41: 673—82.
- Torrey, J. G., 1968. Hormonal control of cytodifferentiation in agar and cell suspension cultures. In: *Biochemistry and physiology of plant growth substances*. Ed. F. Wightman and G. Setterfield, Runge Press, Ottawa, pp: 843—55.
- Torrey, J. G., 1975. Tracheary element formation from single isolated cells in culture. *Physiol. Plant.* 35: 158—65.
- Torrey, J. G., Fosket, D. E., 1970. Cell division in relation to cytodifferentiation in cultured pea root segments. *Am. J. Bot.* 57: 1072—80.
- Varner, J. E., 1964. Gibberellic acid controlled synthesis of amylase in barley endosperm. *Plant Physiol.* 39: 413—15.
- Varner, J. E., 1967. Hormonal control of enzyme production in barley endosperm. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 144: 219—21.

- Wetmore, R. H., DeMaggio, A. E., Rier, J. P., 1964. Contemporary outlook on the differentiation of vascular tissues. *Phytomorphol.* 14: 203—17.
- Wetmore, R. H., Rier, J. P., 1963. Experimental induction of vascular tissues in callus of angiosperms. *Am. J. Bot.* 50: 418—30.
- Witham, F. H., 1968. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the cytokinin requirement of soybean cotyledon and tobacco stem pith callus tissues. *Plant Physiol.* 43: 1455—7.
- Wright, K., Northcote, D. H., 1973. Differences in ploidy and degree of intercellular contact in differentiating and non differentiating sycamore calluses. *J. Cell Sci.* 12: 37—53.
- Zajaczkowski, S., Wodzicki, T. J., 1978. Auxin and plant morphogenesis — a model of regulation. *Acta Soc. Bot. Pol.* 47: 233—43.

Mgr JOANNA KOPCIŃSKA

Instytut Biologii Roślin, Zakład Botaniki SGGW-AR,
ul. Rakowiecka 26/30, 02-528 Warszawa