Uniwersytet Śląski

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Wpływ wzrostu modulowanego pH i naprężeniem na układ mikrotubul kortykalnych w epidermie hipokotyla słonecznika

Agata Burian

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. Zygmunta Hejnowicza
w Katedrze Biofizyki i Biologii Komórki
Uniwersytetu Śląskiego

Katowice 2007

Spis treści

I. WSTĘP----------5

1. WZROST KOMÓRKI ROŚLINNEJ----------5
1.1. Podstawowe pojęcia----------5
1.2. Wzrost komórki roślinnej jako proces biofizyczny----------9
1.3. Ściana komórkowa: budowa i skład chemiczny----------11
1.4. Modele tworzenia pierwotnej ściany komórkowej----------12
1.5. Hipoteza kwasowego wzrostu----------15
1.6. Mikrofibryle celulozowe i kierunek maksymalnego wzrostu----------18
2. ZNACZENIE NAPRĘŻEŃ W BUDOWIE I FUNKCJONOWANIU ORGANIZMÓW----------20
2.1. Tensegralność----------20
2.2. Naprężenia tkankowe i ich rola we wzroście organów roślinnych----------22
2.3. Znaczenie epidermy we wzroście organów roślinnych----------24
3. MIKROTUBULE: BUDOWA, DYNAMIKA I ORGANIZACJA----------25
3.1. Budowa mikrotubul----------25
3.2. Dynamika mikrotubul----------27
3.3. Powstanie i organizacja mikrotubul w komórce----------29
3.4. Białka MAP----------31
3.5. Polarność układów mikrotubul kortykalnych----------33
3.6. Cykliczna reorientacja układów mikrotubul kortykalnych w komórce roślinnej----------34
4. UDZIAŁ MIKROTUBUL KORTYKALNYCH W MORFOGENEZIE----------37
4.1. Wpływ wzrostu (odkształcenia plastycznego ściany) na układ mikrotubul kortykalnych. Hipoteza Schopfera----------38
4.2. Wpływ mikrotubul kortykalnych na układ mikrofibryli celulozowych i na odwrót----------39
4.3. Wpływ mikrotubul kortykalnych na anizotropię wzrostu komórek roślinnych----------42
4.4. Mikrotubule kortykalne, chiralność i wzrost spiralny----------43
4.5. Wpływ naprężenia na mikrotubule kortykalne----------46
5. METODY BADAŃ ORIENTACJI MIKROTUBUL----------49
6. ZADANIA I CEL PRACY----------52

II. MATERIAŁY I METODY----------54

1. MATERIAŁ----------54
2. POMIAR SZYBKOŚCI WZROSTU HIPOKOTYLA *IN SITU*----------55
3. POMIAR DŁUGOŚCI I SZEROKOŚCI KOMÓREK EPIDERMY----------55
4. BADANIE ORIENTACJI MIKROTUBUL KORTYKALNYCH W EPIDERMIE *IN SITU*----------55
5. BADANIE KINETYKI ZMIAN ORIENTACJI MIKROTUBUL KORTYKALNYCH PO WYIZOLOWANIU EPIDERMY Z HIPOKOTYLA----------56
6. BADANIE WPŁYWU SPOSOBU ODDZIELANIA PASA EPIDERMY Z HIPOKOTYLA----------56
7. BADANIE WPŁYWU pH I NAPRĘŻENIA NA ORIENTACJĘ MIKROTUBUL KORTYKALNYCH W IZOLOWANYCH PASACH EPIDERMY----------56
8. IMMUNOCYTOCHEMICZNE ZNAKOWANIE MIKROTUBUL KORTYKALNYCH----------58
9. ANALIZA ILOŚCIOWA ORIENTACJI MIKROTUBUL KORTYKALNYCH----------58
10. POMIAR SZYBKOŚCI WZROSTU IZOLOWANCH PASÓW EPIDERMY W ZALEŻNOŚCI OD pH I NAPRĘŻENIA----------62
11. BADANIE WPŁYWU FUZIKOKCYNY NA SZYBKOŚĆ WZROSTU IZOLOWANYCH PASÓW EPIDERMY ORAZ NA ORIENTACJĘ MIKROTUBUL KORTYKALNYCH----------62
12. BADANIE WPŁYWU ŚWIATŁA BIAŁEGO NA ORIENTACJĘ MIKROTUBUL KORTYKALNYCH W PASACH EPIDERMY INKUBOWANYCH PRZEZ 12-14 GODZIN------63

III. WYNIKI----------64

1. CHARAKTERYSTYKA BADANYCH STREF EPIDERMY HIPOKOTYLA----------64
1.1. Szybkość wzrostu wydłużeniowego i rozmiary komórek----------64

1.2. Ogólna charakterystyka mikrotubul kortykalnych----------66
1.3. Orientacja mikrotubul kortykalnych w epidermie in situ----------68
1.4. Zmienność orientacji mikrotubul kortykalnych z uwzględnieniem kierunku obwodowego--------
71
2. ZMIANY ORIENTACJI MIKROTUBUL KORTYKALNYCH SPOWODOWANE IZOLACJĄ PASÓW EPIDERMY Z HIPOKOTYLA----------73
3. WPŁYW SPOSOBU ODDZIELANIA PASÓW EPIDERMY Z HIPOKOTYLA NA REORIENTACJĘ MIKROTUBUL KORTYKALNYCH PO IZOLACJI----------76
4. WPŁYW pH I NAPRĘŻENIA ROZCIĄGAJĄCEGO NA WZROST WYDŁUŻENIOWY IZOLOWANYCH PASÓW EPIDERMY----------78
5. ORIENTACJA MIKROTUBUL KORTYKALNYCH W IZOLOWANYCH PASACH EPIDERMY RÓŻNIĄCYCH SIĘ SZYBKOŚCIĄ WZROSTU MODULOWANĄ ZA POMOCĄ pH I NAPRĘŻENIA----------82
6. WPŁYW pH NA ORIENTACJĘ MIKROTUBUL KORTYKALNYCH W IZOLOWANYCH PASACH EPIDERMY----------88
7. WPŁYW ŚWIATŁA BIAŁEGO NA ORIENTACJĘ MIKROTUBUL KORTYKALNYCH W IZOLOWANYCH PASACH EPIDERMY INKUBOWANYCH PRZEZ 12-14 GODZIN----------90
8. WPŁYW FUZIKOKCYNY NA WZROST WYDŁUŻENIOWY IZOLOWANYCH PASÓW EPIDERMY PREINKUBOWANYCH PRZEZ 12-14 GODZIN----------93
9. WPŁYW FUZIKOKCYNY NA WZROST WYDŁUŻENIOWY IZOLOWANYCH PASÓW EPIDERMY PREINKUBOWANYCH PRZEZ 1 GODZINĘ----------95
10. ORIENTACJA MIKROTUBUL KORTYKALNYCH W IZOLOWANYCH PASACH EPIDERMY RÓŻNIĄCYCH SIĘ SZYBKOŚCIĄ WZROSTU ZALEŻNĄ OD FUZIKOKCYNY--96
11. ZALEŻNOŚĆ POMIĘDZY CZĘSTOŚCIĄ WYSTĘPOWANIA ORIENTACJI POPRZECZNYCH ORAZ PODŁUŻNYCH I SZYBKOŚCIĄ WZROSTU ZALEŻNĄ OD FUZIKOKCYNY----------101

IV. DYSKUSJA----------103

1. WPŁYW SZYBKOŚCI WZROSTU NA ORIENTACJĘ MIKROTUBUL KORTYKALNYCH. HIPOTEZA SCHOPFERA----------103
1.1 Orientacja mikrotubul kortykalnych w epidermie in situ----------104
1.2 Orientacja mikrotubul kortykalnych w izolowanych pasach epidermy----------104
1.3. Wpływ szybkości wzrostu indukowanego przez naprężenie i niskie pH buforu na orientację mikrotubul kortykalnych w pasach inkubowanych przez 12-14h----------107
1.4 Wpływ szybkości wzrostu indukowanego przez naprężenie i fuzikokcynę na orientację mikrotubul kortykalnych w pasach inkubowanych przez 1h----------110
2. WPŁYW NAPRĘŻENIA NA ORIENTACJĘ MIKROTUBUL KORTYKALNYCH----------111
2.1. Anizotropia naprężenia, odkształcenia elastycznego oraz orientacja mikrotubul kortykalnych w nienaprężanych pasach epidermy----------112
2.2. Anizotropia naprężenia, odkształcenia elastycznego oraz orientacja mikrotubul kortykalnych w naprężanych pasach epidermy----------116
2.3. Anizotropia naprężenia, odkształcenia oraz orientacja mikrotubul kortykalnych w epidermie in situ----------118
3. CYKLICZNA REORIENTACJA UKŁADÓW MIKROTUBUL KORTYKALNYCH----------120
4. ZNACZENIE MIKROTUBUL KORTYKALNYCH DLA CHIRALNOŚCI STRUKTURY ŚCIANY I JEJ WZROSTU----------121

V. WNIOSKI----------123

LITERATURA----------125

I. WSTĘP

Pojęcie wzrostu organizmów żywych ma dwa główne znaczenia: powiększanie wymiarów komórek i organów, na przykład wydłużanie, oraz powiększanie ilości komórek i ich składników, na przykład wzrost świeżej masy. W niniejszej pracy pojęcie wzrostu jest stosowane w pierwszym znaczeniu.

Komórki roślinne posiadają ściany komórkowe, dlatego też ich wzrost wymaga powiększania ściany czyli jej odkształcania. To zachodzi tylko wtedy, gdy ściana jest naprężona, czyli działają na nią siły, i to w stopniu takim, że do odkształcenia elastycznego czyli odwracalnego, dodaje się odkształcenie plastyczne - nieodwracalne. Odkształcenie elastyczne jest wprost proporcjonalne do naprężenia, a jego szybkość jest stała. Natomiast zależność odkształcenia plastycznego od naprężenia nie jest liniowa, a szybkość odkształcenia plastycznego zależy od czasu.

1. WZROST KOMÓRKI ROŚLINNEJ

1.1. PODSTAWOWE POJĘCIA

Naprężenie definiuje się jako siłę działającą na jednostkę powierzchni. Jeżeli siłę oznaczymy jako F a powierzchnię jako A to naprężenie (σ) wyraża się następującym wzorem:

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad \left[\frac{N}{m^2}\right]$$

Gdy siła jest skierowana prostopadle do przekroju poprzecznego wówczas naprężenie jest określane jako normalne (σ). Jeżeli siła działa stycznie do danej powierzchni, powstające naprężenie jest nazywane ścinającym (τ).

Materiał pod wpływem działania sił (naprężenia rozciągającego lub ściskającego) ulega odkształceniu (ε), które zależy od oddziaływań między atomami. Odkształcenie można obliczyć jako stosunek zmiany wymiarów ciała (na przykład długości) pod wpływem siły do wymiarów początkowych:

$\varepsilon = \frac{l - l_0}{l_0}$, gdzie „$l$” to wymiar w danym momencie, „l_0” to wymiar początkowy.

W rzeczywistości w wielu materiałach działanie siły powoduje zmianę wymiarów nie tylko w kierunku równoległym do działającej siły, lecz również

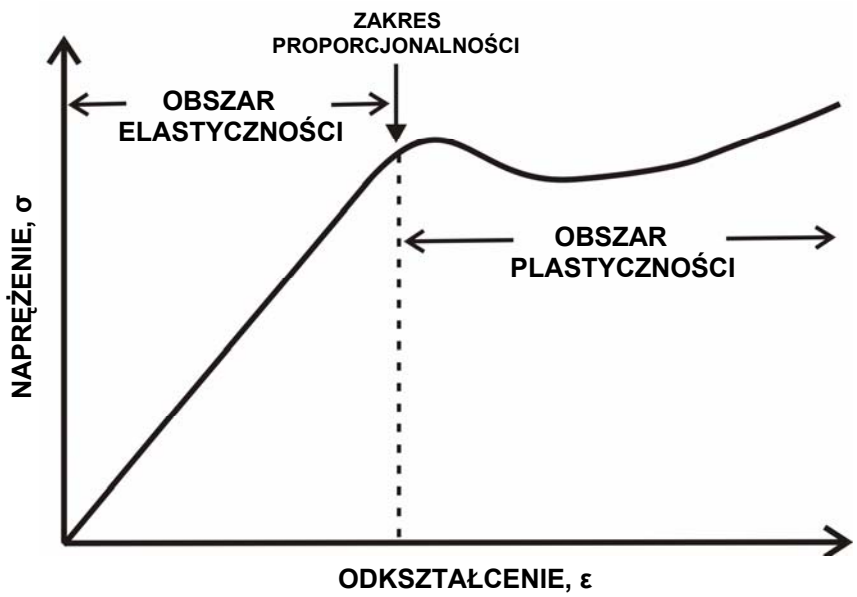
w kierunku prostopadłym. Rozciągany pasek w kierunku *x* jest jednocześnie zwężany w kierunku *y*, prostopadłym do siły. Współczynnik określający zmianę wymiarów w dwóch ortogonalnych kierunkach pod wpływem siły to współczynnik Poissona (ν) dla danych kierunków.

$\nu_{xy} = -\frac{\varepsilon_y}{\varepsilon_x}$, gdzie ε_x jest odkształceniem w kierunku działania siły; ε_y jest odkształceniem w kierunku prostopadłym do *x*. Współczynnik Poissona jest liczbą dodatnią, bowiem odkształcenia w kierunku *x* i *y* mają przeciwne znaki. W materiałach anizotropowych $\nu_{xy} \neq \nu_{yx}$, czyli odkształcenie jest różne w różnych kierunkach; podczas gdy w materiałach izotropowych, gdzie $\nu_{xy} = \nu_{yx}$, odkształcenie jest takie samo niezależnie od kierunku, oraz $0 \leq \nu \leq 0.5$. W materiałach anizotropowych niektóre współczynniki Poissona mogą by większe od 0.5. Tkanki miękiszowe o izodiametrycznych komórkach posiadają właściwości izotropowe. Większość tkanek będących częścią układu mechanicznego roślin, jak i same ściany komórkowe, wykazują właściwości anizotropowe warunkowane specyficznym ułożeniem mikrofibryl celulozowych (MF) w ścianie oraz układem komórek.

Robert Hooke w 1676 określił zachowanie elastycznych materiałów jako „*ut tensio sic vis*" („jakie odkształcenie, taka siła"). Stąd prawo Hooke'a: w materiałach elastycznych naprężenie normalne (σ) i odkształcenie (ε) w materiałach elastycznych są proporcjonalne (**Ryc.1**). Nachylenie linii na wykresie zależności naprężenia i odkształcenia w obszarze, gdzie te dwie wielkości są proporcjonalne (obszar elastyczności) to moduł elastyczności (Younga).

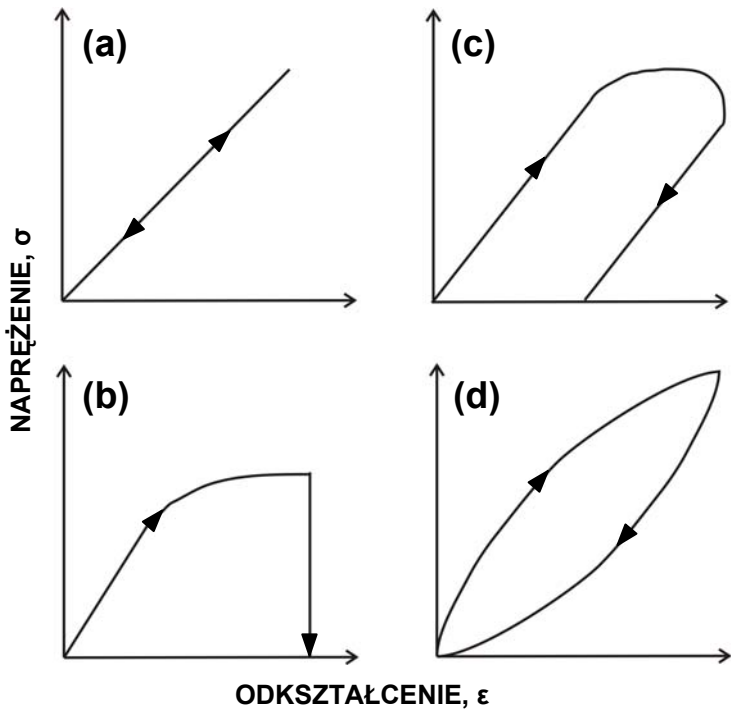
$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon}$$

W obszarze elastyczności dany materiał jest odkształcany odwracalnie, co znaczy, że po usunięciu sił materiał wraca do swych początkowych wymiarów. Powyżej zakresu proporcjonalności materiał jest odkształcany częściowo nieodwracalnie (plastycznie). Po osiągnięciu wartości zwanej granicą wytrzymałości następuje płynięcie; materiał ulega stosunkowo dużemu odkształceniu przy niewielkim wzroście naprężenia, co prowadzi do zniszczenia materiału (rozerwaniu przy naprężaniu rozciągającym).



Ryc.1. Zależność między naprężeniem (σ) i odkształceniem (ε). Początkowo materiał odkształcany jest odwracalnie (obszar elastyczności). Nachylenie linii w tym obszarze to moduł Younga ($E = \sigma / \varepsilon$). Po przekroczeniu zakresu proporcjonalności materiał odkształcany jest nieodwracalnie (obszar plastyczności). Odkształcanie w obszarze plastyczności przedstawiono w pewnych równych odstępach czasowych; przy innych odstępach linia odkształcenia byłaby inna.

W zależności od rodzaju materiału linie zależności naprężenia i odkształcenia przyjmują różne kształty (**Ryc.2**). Materiał idealnie elastyczny charakteryzuje się liniowym przyrostem odkształcenia pod wpływem naprężenia (w granicach proporcjonalności), a po usunięciu naprężenia materiał wraca do początkowych wymiarów, w przeciwieństwie do materiału plastycznego. Odkształcenie plastyczne wiąże się z nieodwracalnymi zmianami w strukturze materiału. Pojawienie się odkształcenia plastycznego objawia się zmniejszeniem nachylenia stycznej do linii przedstawiającej naprężenie w funkcji odkształcenia; odkształcanie to jest kontynuowane nawet przy stałym naprężeniu. Materiał o właściwościach elastoplastycznych przy małym naprężeniu zachowuje się jak materiał elastyczny i wtedy szybkość odkształcenia elastycznego nie zależy od czasu. Materiał taki ma granice naprężenia, do której nie następuje odkształcenie nieodwracalne; powyżej tej granicy odkształca się już częściowo nieodwracalnie, a szybkość takiego odkształcenia zmienia się w czasie. Szczególnym przypadkiem jest materiał wiskoelastyczny, który po usunięciu naprężenia może powrócić do wyjściowych wymiarów (lub powrócić tylko częściowo), lecz z pewnym opóźnieniem. Materiały biologiczne takie jak ściany komórkowe, a w konsekwencji komórki i tkanki mają cechy materiałów wiskoelasycznych.



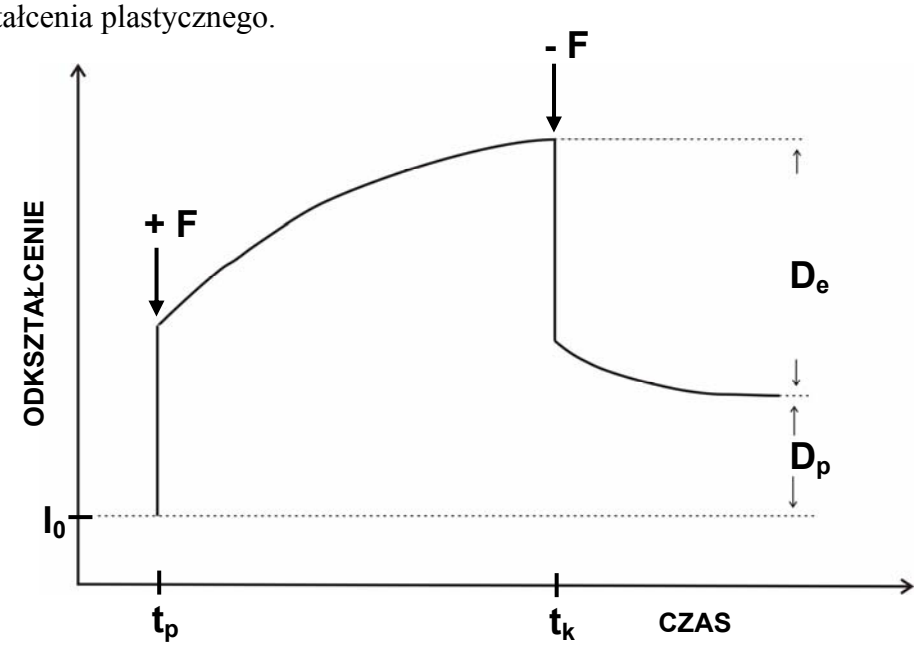
Ryc. 2. Zależność między naprężeniem (σ) i odkształceniem (ε) w różnych materiałach: **(a)** materiał idealnie elastyczny, **(b)** materiał plastyczny, **(c)** materiał elastoplastyczny, **(d)** materiał wiskoelastyczny. Wykresy **(b)**, **(c)**, **(d)** dotyczą określonych reżimów czasowych, przy innym reżimie odkształcenie byłoby inne.

Właściwości mechaniczne materiałów biologicznych bada się w sposób dynamiczny, gdzie naprężenie lub odkształcenie zmienia się cyklicznie w czasie; oraz stosując metody, w których materiał jest poddany stałemu naprężeniu (izotonia) a mierzone jest odkształcenie w czasie (test pełzania, z ang. creep experiment) lub stałemu odkształceniu (izometria) a mierzone jest naprężnie (test relaksacji, z ang. stress-relaxation experiment).

Wydłużanie materiału wiskoelastycznego, jakim są ściany komórkowe, poddanego stałemu naprężeniu rozciągającemu, jest najczęściej tylko częściowo odwracalne (**Ryc.3**). Początkowo po przyłożeniu siły obserwuje się natychmiastowe wydłużenie elastyczne (De), po którym następuje stosunkowo wolne pełzanie (z ang. creep), zależne od czasu. Gdy siła zostanie usunięta, próbka ulega natychmiastowemu elastycznemu kurczeniu, po którym następuje wolne kurczenie. Różnica pomiędzy stanem początkowym a końcowym to odkształcenie plastyczne (Dp). Szybkość odkształcania może być proporcjonalna do naprężenia.

$\frac{1}{l}\frac{\Delta l}{\Delta t} = \varphi(\sigma - \sigma_0)$, gdzie „l" to wymiar materiału w kierunku rozciągania, $\frac{1}{l}\frac{\Delta l}{\Delta t}$ jest względną szybkością wydłużania (nieodwracalnego); „φ" to współczynnik

proporcjonalności nazywany również podatnością ściany (z ang. extensibility), „σ" to naprężenie normalne w kierunku „*l*", „σ_0" to wartość progowa naprężenia dla odkształcenia plastycznego.



Ryc.3. Zmiana wymiaru liniowego ściany komórkowej pod stałym naprężeniem rozciągającym w zależności od czasu. Po przyłożeniu siły (***F***) w czasie (t_p) pojawia się natychmiastowe odkształcenie elastyczne (D_e), po czym narasta odkształcenie elastyczne opóźnione (wiskoelastyczne) i odkształcenie plastyczne (***Dp***). Po usunięciu siły w czasie (t_k) ściana ulega gwałtownemu elastycznemu kurczeniu, po którym następuje wolniejsze, opóźnione elastyczne kurczenie. Ściana nie powraca do pierwotnych rozmiarów, ponieważ uległa odkształceniu plastycznemu.

1.2. WZROST KOMÓRKI ROŚLINNEJ JAKO PROCES BIOFIZYCZNY

Wzrost komórki roślinnej można zdefiniować jako nieodwracalne odkształcenie ściany komórkowej pod wpływem ciśnienia turgorowego (Green 1962).

Na wzrost komórki składają się dwa procesy: nieodwracalne odkształcenie ściany komórkowej (z ang. yielding) oraz (z reguły) pobieranie wody (yielding może wystąpić bez pobierania wody gdy zmienia się kształt komórki przy zachowaniu objętości). W skrócie proces wzrostu można przedstawić następująco: ciśnienie hydrostatyczne (turgorowe) protoplastu warunkuje stan naprężenia w ścianie komórkowej. Rozluźnienie struktury ściany powoduje relaksację naprężenia (redukcja naprężenia przy stałym odkształceniu), co wiąże się z obniżeniem ciśnienia turgorowego w komórce. Komórka pobiera wodę, następuje zwiększenie objętości komórki i rozmiarów ściany komórkowej (jej płynięcie, czyli wzrost odkształcenia przy stałym naprężeniu), [Cosgrove 1986, 1987]. Należy podkreślić, że komórki w organie są połączone ze sobą blaszkami środkowymi, dlatego też procesy wzrostowe muszą być skoordynowane w obrębie tkanki oraz organu (wzrost symplastyczny).

Względna szybkość wzrostu objętościowego komórki zależy w głównej mierze od ciśnienia turgorowego i właściwości ściany według wzoru analogicznego dla odkształcenia plastycznego w jednym kierunku:

$\frac{1}{V}\frac{dV}{dt} = \phi(P - Y)$, (zwanego zwykle wzorem Lockhart'a) gdzie „*V*" to objętość komórki,, „φ" to podatność ściany, „*P*" to ciśnienie turgorowe, „*Y*" to próg plastycznego odkształcania (czyli minimalna wartość ciśnienia turgorowego potrzebnego do wywołania odkształcenia nieodwracalnego). Skądinąd wiadomo, że to zmiany właściwości ściany generują różne profile wzrostu w organach a nie zmiany ciśnienia turgorowego (Prichard *et al.* 1993). Rozluźnienie ściany komórkowej może nastąpić w wyniku zerwania lub osłabienia wiązań pomiędzy elementami ściany za pomocą enzymów hydrolitycznych i białek nie-enzymatycznych (takich jak ekspansyny). W komórkach nierosnących relaksacja prawie nie występuje, co oznacza, że naprężenie nie przekracza wartości progowej.

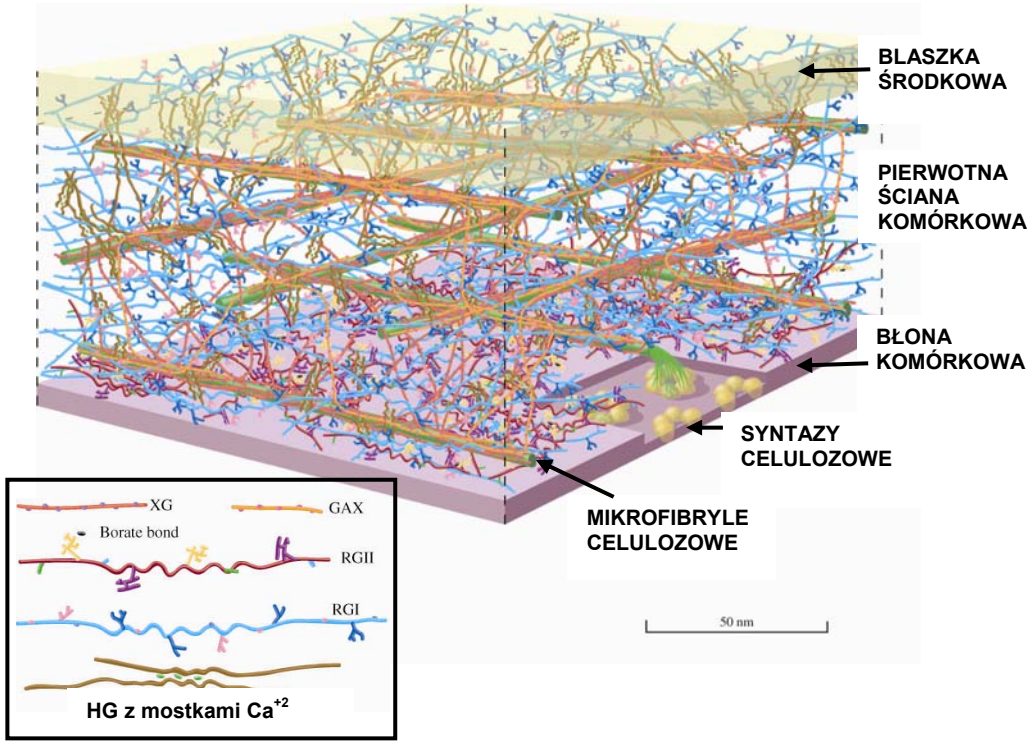
Rozszerzeniem równania Lockhart'a jest równanie przedstawione przez Ortega (1985) uwzględniające odkształcenie elastyczne:

$\frac{1}{V}\frac{dV}{dt} = \phi(P - Y) + \frac{1}{E_{el}}\frac{dP}{dt}$, gdzie „$E_{el}$" jest modułem elastyczności. Wyrażenie $\phi(P - Y)$ określa nieodwracalne odkształcenie (wzrost), gdy tylko wartość ciśnienia turgorowego przekroczy wartość progową dla odkształceń nieodwracalnych; zaś wyrażenie $\frac{1}{E_{el}}\frac{dP}{dt}$ odkształcenie odwracalne (elastyczne).

W komórkach roślinnych wzrost może obejmować całą powierzchnię komórki (wzrost dyfuzyjny), albo występuje tylko w części powierzchni komórki, na przykład na szczycie wydłużonej komórki (wzrost szczytowy). Gdy szybkość wzrostu jest różna w różnych częściach ściany (komórki) mówimy o zróżnicowanym wzroście (z ang. differential growth). Jeśli szybkość wzrostu jest taka sama w różnych kierunkach, wówczas wzrost jest określany jako izotropowy. Wzrost jest anizotropowy, gdy szybkość wzrostu w jednym z dwu prostopadłych kierunków (w płaszczyźnie ściany) przeważa (na przykład wzrost elongacyjny).

1.3. ŚCIANA KOMÓRKOWA: BUDOWA I SKŁAD CHEMICZNY

Z punktu widzenia mechaniki, ściana komórkowa może być uważana za periodyczny materiał kompozytowy, zbudowany ze składnika szkieletowego, którym są polimery polisacharydów oraz amorficznej macierzy (matriks) (**Ryc.4**), [Niklas 1992]. Właściwości mechaniczne ściany są w dużej mierze zależne od długości polimerów oraz siły i rodzaju wiązań pomiędzy poszczególnymi składnikami ściany.



Ryc. 4. Schemat budowy ściany komórkowej z uwzględnieniem polisacharydów. Hemicelulozy: XG (ksyloglukany), GAX (glukoronoarabinoksylan); pektyny: RG I i RG II (ramnogalakturonoan), HG (homogalakturonian), (Somerville *et al.* 2004, zmienione).

Mikrofibryle (MF) celulozowe (o średnicy około 3nm) zbudowane są z łańcuchów celulozy połączonych ze sobą wiązaniami wodorowymi, przy czym rdzeń MF ma strukturę krystaliczną, powierzchnia zaś jest amorficzna (Vincent 1999). Mikrofibryle łączą się ze sobą w pęczki, tworząc struktury wyższego rzędu – fibryle, widoczne już w mikroskopie optycznym.

Miejscem syntezy celulozy jest błona komórkowa. Kompleks syntazy celulozowej ma średnicę około 25-30nm i składa się z 6 podjednostek, które są ułożone w charakterystyczną symetryczną rozetkę, zwaną również kompleksem terminalnym (TC). Każda podjednostka syntetyzuje 6 nierozgałęzionych łańcuchów, zbudowanych z β-1-4-glukanu, które połączone wiązaniami wodorowymi, tworzą MF o 30-63 łańcuchach (Sommerville *et al.* 2004). Do procesu polimeryzacji celulozy oprócz

syntazy niezbędne są substraty w postaci UDP-glukozy, podczas gdy żadne ze znanych białek nie jest niezbędne do krystalizacji łańcuchów celulozy w MF. Elementy syntazy celulozy są dostarczane do błony z aparatu Golgiego za pomocą pęcherzyków sekrecyjnych (Paredez *et al.* 2006); nie wiadomo jednak czy proces składania podjednostek w rozetkę następuje przed czy po fuzji pęcherzyka z błoną komórkową (Saxena i Brown 2005). Celuloza charakteryzuje się dużym modułem elastyczności rzędu 30-40 GN m^{-2}, w porównaniu na przykład do matriks (10^7-10^8 N m^{-2}).

Hemicelulozy w postaci rozgałęzionych łańcuchów polisacharydowych wiążą się niekowalencyjnie do MF, prawdopodobnie łączą MF między sobą, jak również mocują MF w matriks. Badanie parametrów mechanicznych izolowanych komponentów ściany wykazało, że dodanie xyloglukanów do sieci czystej celulozy powoduje wzrost rozciągliwości takiego kompozytu oraz obniżenie jego sztywności (Chanliaud *et al.* 2002). Ponadto obecność xyloglukanów warunkuje odkształcenie zależne od czasu (pełzanie), w przeciwieństwie do kompozytu celulozowo-pektynowego i czystej celulozy, które wykazywały własności elastyczne.

Pektyny są głównym składnikiem matriks, wypełniają wolne przestrzenie pomiędzy MF, podlegają różnym modyfikacjom, między innymi wiążą jony Ca^{2+} (Vincent 1999). Pektyny, podobnie jak hemicelulozy, są syntetyzowane w aparacie Goldiego i transportowane do ściany w pęcherzykach sekrecyjnych. Rola pektyn to głównie regulacja porowatości ściany, kontrola środowiska jonowego ściany oraz łączenia ścian sąsiednich komórek poprzez blaszki środkowe, których są głównym składnikiem (Somerville *et al.* 2004).

W ścianie komórek występują białka strukturalne - ekstensyny. Budową przypominają małe sprężynki, na tyle silnie zakotwiczone w ścianie, że są bardzo trudne do usunięcia. Ich rola nie jest dostatecznie wyjaśniona. Ekstensyny prawdopodobnie wiążą poszczególne składniki ściany (Vincent 1999).

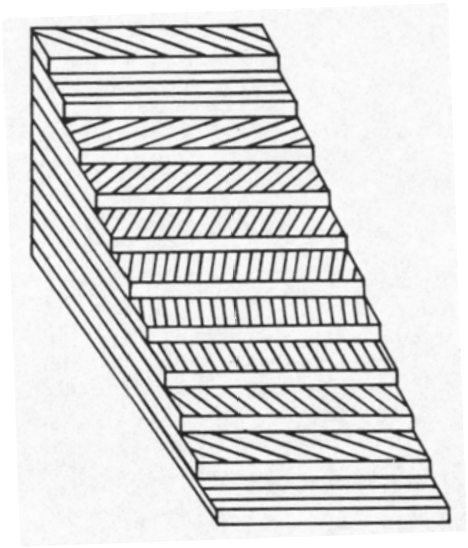
1.4. MODELE TWORZENIA PIERWONEJ ŚCIANY KOMÓRKOWEJ

Istnieją dwa niewykluczające się modele budowy ściany pierwotnej, czyli ściany tworzonej w okresie wzrostu komórki: wielosiatkowy (z ang. multinet model) oraz helikoidalny (z ang. helicoidal model).

Według wielosiatkowego modelu MF są odkładane poprzecznie względem kierunku maksymalnego wzrostu. Ten poprzeczny układ w ostatnio odłożonej warstwie podlega stopniowej reorientacji na podłużny wskutek rozciągania, które towarzyszy

wzrostowi komórki. W poprzek ściany istnieje więc gradient odkształcenia, w najbardziej wewnętrznej (najmłodszej) warstwie odkształcenia nie ma lub jest ono bardzo niewielkie, w najbardziej zewnętrznej (najstarszej) warstwie odkształcenie jest maksymalne. Istnieją dane eksperymentalne potwierdzające słuszność założeń wielosiatkowego modelu: naprężanie komórek powoduje zmianę orientacji MF w zewnętrznych warstwach ściany (Gertel i Green 1977).

W helikoidalnym modelu, MF w czasie ich wytwarzania ułożone są równolegle a kąt nachylenia MF w kolejno tworzonych warstewkach zmienia się o określoną wartość w sposób rotacyjny. Wyrazem tego jest charakterystyczny „łukowaty" wzór MF na skośnie skrojonych preparatach (Neville 1988), [**Ryc.5**]. Wzory te są regularne, gdy kąt nachylenia równoległych MF zmienia się w czasie o stałą określoną wartość. Regularność wzoru może być zaburzona w pewnym stopniu, gdy cykl rotacji MF zatrzyma się na dłużej lub „przeskoczy" przez daną orientację (Roland *et al.* 1987). Układ MF może też być dodatkowo modyfikowany poprzez odkształcenia rozciągające podczas wzrostu komórki. U roślin naczyniowych helikoidalny układ MF występuje w pierwotnej ścianie epidermy, kolenchymy, włośników, oraz często w komórkach miękiszowych z grubszymi ścianami.



Ryc. 5. Schemat helikoidalnej ściany komórkowej ściętej ukośnie z widocznymi mikrofibrylami celulozowymi tworzącymi charakterystyczny łukowaty wzór (Neville 1988).

Przedstawione modele różnią się głównie wyjściową orientacją MF, tj. w ostatnio odłożonej warstewce ściany MF są poprzeczne w stosunku do kierunku wydłużania w przypadku ściany wielosiatkowej, mają zaś zmienną w czasie orientację w przypadku ściany helikoidalnej. Zarówno wielosiatkowy jak i helikoidalny model

zakłada, że w miarę wzrostu komórki układ MF ulega reorientacji, przy czym stopień odkształcenia każdej z warstewek w ściany zależy od jej odległości od błony komórkowej (gradient odkształcenia w poprzek ściany). W czasie wzrostu komórki maleje również grubość warstewek.

Reorientacja MF powinna występować również w czasie rozciągania ściany *in vitro*. Okazało się jednak, że podczas testu pełzania zamrożonych i odmrożonych (z ang. frozen-thawed) segmentów hipokotyla w obecności ekspansyn lub buforu o pH kwaśnym nie zaobserwowano reorientacji MF w najbardziej wewnętrznych warstwach ścian: zarówno w próbkach naprężanych jak i nienaprężanych układ MF był poprzeczny (Marga *et al.* 2005).

Według helikoidalnego modelu ściana wykazuje podobieństwo do struktury ciekłych kryształów typu cholesterycznego. Ciekłe kryształy zostały odkryte przez botanika Friedricha Reinitzera w 1888, który zajmował się strukturą estrów cholesterolu. Podstawowym kryterium, określającym czy dana substancja tworzy fazę ciekłokrystaliczną jest anizotropia geometryczna tworzących ją cząsteczek - ich kształt musi być podłużny (Bauman 2002). Wyróżnia się różne typy ciekłych kryształów, między innymi nematyczne, w których długie osie cząsteczek ustawione są równolegle do pewnego, wyróżnionego kierunku (jak w wewnętrznej warstewce ściany typu wielosiatkowego) oraz cholesterolowe, gdzie osie cząsteczek w kolejnych płaszczyznach (warstewkach) są skręcone względem siebie o pewien kąt, jak na przykład w ścianie helikoidalnej. Wprawdzie struktura helikoidalna dotyczy celulozowych MF, jednakże wszystko wskazuje na to, że MF same nie mogą organizować struktur ciekłokrystalicznych (Neville 1988). Eksperymentalnie stwierdzono, że *in vitro* MF dopiero po związaniu z glukuronoksylanami układają się spontanicznie we wzór charakterystyczny dla ciekłych kryształów (Reis *et al.* 1991). Prawdopodobnie to hemicelulozy organizują helikoidalny układ MF; ich cząsteczki spełniają warunki do tworzenia struktur ciekłokrystalicznych (długie i sztywne łańcuchy główne, obecność łańcuchów bocznych, asymetria cząsteczki), (Neville 1988).

Znane są również inne koncepcje tworzenia się ściany: Emons i Mulder (2000) przedstawiły geometryczny model dla układu MF. W modelu tym kąt odkładania się MF zależy od gęstości rozłożenia aktywnych syntaz celulozowych w błonie, odległości pomiędzy poszczególnymi MF w jednej warstwie (lameli) oraz geometrii komórki. Komórka może więc kontrolować mechanizm tworzenia ściany między innymi poprzez regulację włączania kompleksów syntaz do błony (egzocytoza) oraz ich aktywację.

Synteza i odkładanie MF oraz innych składników ściany nie jest skorelowana z prędkością wydłużania (Kutschera 1990, Refrégier *et al.* 2004). W hipokotylu *Arabidopsis* grube polilamellarne ściany wykryto w strefie wolnego wzrostu, podczas gdy komórki szybko rosnące miały ściany cienkie. Wydaje się prawdopodobnym więc, że synteza składników ściany oraz jej wydłużanie są procesami niezależnymi.

1.5. HIPOTEZA KWASOWEGO WZROSTU

Faktem od dawna znanym jest to, że auksyna stymuluje wzrost wydłużeniowy organów nadziemnych. Już z badań Heyn'a (1940 cytowane za Kutscherą 1994) wynikało, że mechanizm działania tego hormonu polega głównie na zwiększeniu rozciągliwości ściany komórkowej. Inkubacja w roztworze o pH kwaśnym powoduje przyspieszenie wydłużania oraz zwiększenie rozciągliwości ściany. Podobnie działa fuzikokcyna (FC), toksyna wyizolowana z grzyba *Fusicoccum amygdali*, zwana także super-auksyną, ze względu na wydajniejszą niż auksyna indukcję wzrostu. Okazało się, że zarówno FC, jak i auksyna generują sekrecję protonów do apoplastu. Łącząc te fakty, zaproponowano hipotezę kwasowego wzrostu, w myśl której FC i auksyna indukują wydłużanie organów poprzez zakwaszenie ściany komórkowej (Rayle i Cleland 1980). Zwiększenie koncentracji protonów w apoplaście powoduje rozluźnianie ściany, prowadząc do wzrostu komórki, gdy ściana jest dostatecznie naprężona. Hipoteza ta wywołała swego czasu gorącą dyskusję. Kutschera i Schopfer (1985a), a później i inni (Vesper 1985, Schopfer 1993, Keller i Van Valkenburgh 1998) przedstawili wyniki falsyfikujące hipotezę kwasowego wzrostu odnośnie działania auksyny: *(i)* analiza ilościowa nie wykazała korelacji pomiędzy indukcją wydłużenia segmentów koleoptyli kukurydzy a zakwaszeniem medium; *(ii)* zastosowanie buforów o pH, jakoby wynikającym z działania auksyny (tj. pH 4.5-5), nie powoduje wydłużania, jaki wynikałby z zastosowania auksyny; *(iii)* niskie stężenie protonów (pH w zakresie 6-10) w roztworze inkubacyjnym dla koleoptyli nie wpływa na wydłużanie indukowane auksyną. Kutchera i Schopfer (1985 b) stwierdzili jednak, że FC spełnia warunki hipotezy kwasowego wzrostu: *(i)* sekrecja protonów do medium po zastosowaniu FC jest skorelowana w czasie z indukcją wydłużania segmentów; *(ii)* FC zakwasza medium do pH 3.8-4 i zastosowanie buforów w tym zakresie pH powoduje wydłużanie segmentów, w takim samym stopniu, co pod wpływem FC; *(iii)* przy pH 7 działanie FC odnośnie wydłużania jest zniesione. Co więcej, FC indukuje wydłużanie bez opóźnienia

(z ang. lag-phase), w przeciwieństwie do auksyny, przy zastosowaniu której, takie opóźnienie jest rzędu 15-20 minut.

W odpowiedzi, zaprezentowano badania, z których wynika, że wpływ auksyny można jednak tłumaczyć hipotezą kwasowego wzrostu (Lüthen *et al.* 1990, Cleland *et al.* 1991, Hager *et al.* 1991, Rayle i Cleland 1992). Obecnie bezsporne jest, że indukcja wydłużania przez FC następuje poprzez stymulację aktywności istniejących już pomp protonowych, zaś auksyna poprzez stymulację ich syntezy. W obu przypadkach następuje zakwaszenie apoplastu.

Rozbieżność wyników przedstawionych powyżej badań wynika między innymi z zastosowania różnych technik umożliwiających swobodny przepływ protonów poprzez zewnętrzne ściany epidermy, które, jak wiadomo są pokryte warstwą kutikuli. Kutikula jest barierą nieprzepuszczalną dla wody i protonów, stąd konieczność jej przynajmniej częściowego usunięcia. Kutikula z segmentów kukurydzy była ścierana za pomocą papieru ściernego lub proszku, co jednak wiązało się z częściowym niszczeniem komórek epidermy (Kutschera i Schopfer 1985ab, Lüthen *et al.* 1990). Zastosowanie segmentów kukurydzy, z których usunięto wewnętrzny liść w sposób naturalny rozwiązuje problem nieprzepuszczalności, protony migrują poprzez ściany epidermy od wewnętrznej strony koleoptyla (Karcz *et al.* 1990).

Wypływ protonów z komórki do apoplastu pod wpływem auksyny lub FC dokonuje się z udziałem pomp protonowych (H^+- ATPazy). Większość pomp wrażliwych na FC zlokalizowano w tkankach wewnętrznych, zaś tych, wrażliwych na auksynę w epidermie. Fuzikokcyna, ze względu na brak opóźnienia w wywołaniu reakcji, działa prawdopodobnie bezpośrednio na pompy, bez pośrednictwa genów (Hager *et al.* 1991, Kutschera 1994). We wzroście indukowanym FC istotny jest wpływ jonów K^+ poprzez kanały potasowe do komórki (Tode i Lüthen 2001). Prawdopodobnie służy on kompensacji ładunków dodatnich w komórce, gdy protony są eksportowane do apoplastu. Interesujące są również inne aspekty działania FC: może ona indukować programowaną śmierć komórek, powodując ich kurczenie, zmiany w morfologii jądra i fragmentację DNA (Malerba *et al.* 2003). Wpływ FC odnotowano u zwierząt: traktowanie FC zarodka *Xenopus* w jego wczesnym rozwoju, doprowadziło do zaburzenia asymetrii prawo-lewo; położnie niektórych narządów wewnętrznych (serce, jelita) było odwrócone w stosunku do stanu normalnego (Bunney *et al.* 2003).

Wpływ auksyny na wydłużanie jest procesem dużo bardziej złożonym; zachodzi ekspresja odpowiednich genów, synteza składników ściany, regulacja

transportu pęcherzykowego, jak i bezpośrednia aktywacja pomp protonowych (Hager *et al.* 1991, Abel i Theologis 1996).

Nie wszystkie komórki odznaczają się tym samym potencjałem kwasowego wzrostu. Wiadomo, że ściany komórkowe komórek dojrzałych są mniej podatne na wydłużanie pod wpływem FC lub buforów o pH kwaśnym, niż te pochodzące z komórek młodych (Van Volkenburgh *et al.* 1985). Potwierdzają to badania wydłużania korzenia; po jego inkubacji w środowisku kwaśnym, obserwuje się przyspieszenie wzrostu, ale tylko w częściach apikalnych (Winch i Pritchard 1999).

Gdy już wiadomo było, że wzrost komórek zależy w dużym stopniu od właściwości ściany stawiano pytanie: w jaki sposób komórka reguluje właściwości mechaniczne ściany, jaki jest mechanizm jej rozluźniania prowadzący do wzrostu? Początkowo, stan ściany uzależniano tylko od enzymów hydrolizujących poszczególne składniki ściany: endoglukanaz, endotransglukozylaz ksyloglukanu (XET), pektynaz (Pritchard *et al.* 1993). Przełomem w zrozumienia mechanizmów wzrostu komórki, a w szczególności jego „kwasowego" aspektu było odkrycie ekspansyn.

Ekspansyny należą do białek nie-enzymatycznych, obniżają bowiem energię wiązań wodorowych, a nie kowalencyjnych. Po raz pierwszy zostały wyizolowane ze ścian hipokotyla *Cucumis sativus* (McQueen-Mason *et al.* 1992) jako czynnik wykazujący zdolność indukowania wydłużania izolowanych, ale naprężonych ścian komórkowych oraz relaksacji ich naprężenia (McQueen-Mason i Cosgrove 1995). Co ciekawe, indukcja wydłużania przez ekspansyny dotyczyła tylko rosnących obszarów hipokotyla, nierosnące (bazalne) obszary takiej indukcji nie podlegały. Aktywność ekspansyn ściśle zależy od pH, maksimum aktywności przypada na pH w zakresie 3.5-4.5. Badanie wytrzymałości mechanicznej bibuły filtracyjnej zawierającej czystą celulozę, którą inkubowano w roztworze ekspansyn wykazało, że białka te osłabiają wiązania wodorowe pomiędzy fibrylami celulozowymi, nie wykazując jednocześnie aktywności hydrolitycznej (McQueen-Mason i Cosgrove 1994). W żywej komórce ekpansyny prawdopodobnie zaburzają wiązania wodorowe pomiędzy MF a hemiceluzą tym samym umożliwiając „ślizganie" się wzajemne MF i w efekcie doprowadzając do rozluźnienia struktury ściany (Cosgrove 2000). Obecnie wiadomo, że ekspansyny są „uniwersalnymi" czynnikami warunkującymi wzrost w różnych organach, ponadto mają swój udział w inicjacji zawiązków liści, inicjacji i rozwoju włośników, dojrzewaniu owoców, różnicowaniu elementów trachealnych (Li *et al.* 2003).

1.6. MIKROFOBRYLE CELULOZOWE I KIERUNEK MAKSYMALNEGO WZROSTU

Siłą napędową wzrostu ściany komórkowej jest ciśnienie turgorowe. Gdy ciśnienie to zmniejsza się wskutek relaksacji naprężenia w ścianie, co z kolei spowodowane jest rozluźnieniem struktury ściany, potencjał wody w wakuoli względem apoplastu ulega obniżeniu. Następuje pobranie wody przez komórkę, co z kolei podnosi ciśnienie hydrostatyczne (turgorowe) wywierane na ścianę komórkową. Relaksacja naprężenia w ścianie, prowadzi więc do zwiększenia rozmiaru komórki. Jak już wspomniano, bardzo często wzrost komórki jest anizotropowy. Jednym z czynników wyznaczających kierunek maksymalnego wzrostu jest ułożenie MF. Moduł elastyczności dla wiązki (pęczka) MF mierzony w kierunku osiowym jest około trzy raz większy niż w kierunku poprzecznym. Właściwości mechaniczne ściany zależą od ułożenia MF względem działającej siły (Niklas 1992).

Zależność pomiędzy MF a wzrostem szczególnie jest widoczna w rozwoju protoplastów. Bezpośrednio po izolacji protoplasty pozbawione ściany są sferyczne. Zachowują ten kształt rosnąc po wytworzeniu ściany tylko wtedy, gdy układ MF jest nieuporządkowany. Co więcej, protoplasty pozbawione celulozy (poprzez zastosowanie enzymów celulaz lub traktowanie izoxabenem, inhibitorem syntezy celulozy) przez pewien czas rosną izotropowo (Fisher i Cyr 1998). Gdy przywrócona zostanie synteza celulozy i MF tworzą uporządkowany (równoległy) układ, wzrost staje się anizotropowy. Mikrofibryle tworząc równoległy układ, wyznaczają kierunek maksymalnego wzrostu, prostopadły względem układu MF, czyli protoplasty zaczynają się wydłużać w tym kierunku.

Ogólnie przyjmuje się, że MF ograniczają wzrost w kierunku równoległym do ich orientacji. Układ poprzeczny MF względem długiej osi komórki jest charakterystyczny dla komórek wydłużających się, podczas gdy w komórkach nie wydłużających się układ MF jest podłużny. Rozumując w ten sposób można stwierdzić, że przy skośnym układzie MF wzrost nie jest ograniczony ani w kierunku poprzecznym ani w podłużnym (Hejnowicz *et al.* 2006).

Problem zależności między układem MF a kierunkiem maksymalnego wzrostu jest jednak dużo bardziej złożony. W korzeniach mutanta *mor1* (*microtubule organization*) *Arabidopsis* zaobserwowano zaburzenia w anizotropowym wzroście; prędkość poprzecznego wzrostu była zwiększona, pomimo braku widocznej zmiany w ułożeniu MF (Sugimoto *et al.* 2003). W korzeniach innego mutanta *Arabidopsis rsw4*

i *rsw7* (*radially swollen*) zmniejszenie szybkości elongacji i zwiększenie średnicy korzenia wraz z charakterystycznym „pęcznieniem" tkanek odbywało się przy poprzecznym układzie zarówno mikrotubul kortykalnych (MTk) jak i MF (Wiedemeier *et al.* 2002). Paolillo (2000) obserwował podłużny układ MF w zewnętrznych ścianach epidermy ulegającej wydłużeniu. Według Baskin'a (2005) możliwe jest, że wzrost na długość i szerokość są regulowane niezależnie. Może o tym świadczyć fakt, że oryzalina (substancja zaburzająca MTk) w pewnym obszarze korzenia *Arabidopsis* nie wpływa na jego wzrost podłużny, natomiast zwiększa wzrost poprzeczny (Baskin *et al.* 2004). Należy jednak pamiętać, że MF nie tworzą szczelnych „obręczy" wokół komórki, a raczej nachodzą na siebie i w ten sposób za pomocą różnych cząsteczek łączą się ze sobą.

Anizotropia wzrostu jest charakteryzowana nie tylko przez kierunek, w którym szybkość wzrostu jest maksymalna, ale również przez swój stopień, czyli stosunek maksymalnej szybkości wzrostu do szybkości minimalnej (Baskin 2005). Gdy stosunek ten jest równy 1, wówczas wzrost jest izotropowy, tj. taki sam w różnych kierunkach. Najczęściej jednak w komórkach epidermy korzenia lub hipokotyla, rozważany stosunek jest różny od 1. Dla komórki *Nitella* stopień anizotropii wynosi 4.5 (Green 1964, cytowane za Baskin 2005). Regulacja stopnia anizotropii jest sprawą dyskusyjną.

Green (1964) zaproponował hipotezę zakładającą, że stopień anizotropii wzrostu jest proporcjonalny do stopnia uporządkowania MF w obrębie komórki. Hipoteza ta była oparta na obserwacji komórek *Nitella axillaris*, w której stopień uporządkowania MF był większy niż w komórkach innego gatunku, co wiązało się z większym stopniem anizotropii wzrostu. Miarą stopnia uporządkowania jest odchylenie standardowe od wartości średniej kąta nachylenia. Hipoteza to została sfalsyfikowana przez badania, w których nie znaleziono korelacji pomiędzy odchyleniem standardowym kąta nachylenia MF a stopniem anizotropii wzrostu (Baskin *et al.* 1999, 2004). Jednakże gdy porównano stopień zgodności średniego kąta nachylenia MF pomiędzy sąsiadującymi komórkami (a nie w obrębie jednej komórki), wówczas okazało się, że stopień anizotropii wzrostu jest mniejszy dla obszaru, w którym nachylenie MF w sąsiednich komórkach jest mniej jednolite. Innymi słowy, tkanka rośnie bardziej anizotropowo, gdy nachylenie MF w różnych komórkach jest jednolite; natomiast tkanka, w której orientacja MF jest różna dla różnych komórek, rośnie mniej anizotropowo (nawet pomimo „lokalnego", na poziomie jednej komórki, uporządkowania MF).

2. ZNACZENIE NAPRĘŻEŃ W BUDOWIE I FUNKCJONOWANIU ORGANIZMÓW

2.1. TENSEGRALNOŚĆ

Termin tensegralność odnosi się do stabilności mechanicznej struktur, w których współistnieją elementy ściskane i rozciągane (jeszcze przed zadziałaniem sił zewnętrznych). Struktura tensegralna jest wstępnie naprężona; tylko wtedy jest mechanicznie stabilna (na przykład namiot, składany kajak). Naprężenia wstępne występują w organizmach żywych na wielu poziomach, od struktury trzeciorzędowej polipeptydów, takich elementów cytoszkieletu jak MT, mikrofilementy aktynowe, po całe komórki, organy, organizmy (Ingber 2003a). Na wszystkich też poziomach znajdujemy struktury tensegralne. Taką strukturą jest w szczególności cytoszkielet; mikrofilamenty aktynowe i filamenty pośrednie są naprężone rozciągająco, mikrotubule (MT) są zwykle ściskane. Stan ściśnięcia u tych ostatnich został wykazany w doświadczeniu, w którym indukowane ściskanie cytoszkieletu powodowało lokalne wyboczenia MT (Wang *et al.* 2001). Gdy sieć mikrofilamentów była niszczona za pomocą cytochalazyny D, wygięte wcześniej MT prostowały się. Dodatkowymi czynnikami mającymi swój udział we wstępnym naprężeniu komórki są: przyleganie cytoszkieletu do matriks zewnątrzkomórkowej i innych komórek oraz ciśnienie hydrostatyczne.

U zwierząt receptorami sygnałów naprężeniowych na poziomie komórkowym (mechanoreceptory), są transbłonowe intergryny, związane z różnymi elementami cytoszkieletu (bezpośrednio z mikrofilamentami aktynowymi, a pośrednio również z MT). Doświadczalnie wykazano, że przyłożenie naprężenia do integryn powodowało usztywnienie całej komórki; co więcej odpowiedź ta ściśle zależała od stanu „wyjściowego" naprężeń w komórce (Wang *et al.* 1993). Sygnał mechaniczny w postaci naprężenia może być następnie zamieniany na sygnał chemiczny lub elektryczny, co wiązałoby się z dalszą transdukcją sygnału i zmianą w ekspresji genów (Ingber 2003b).

Naprężenie, podobnie jak odkształcenie elastyczne (odwracalne) lub szybkość odkształcenia plastycznego (nieodwracalnego), czyli szybkość wzrostu jest wielkością tensorową drugiego rzędu, czyli wielkością, przyjmującą określoną wartość w każdym kierunku. W pewnych kierunkach (kierunkach głównych) przyjmuje wartości ekstremalne; w jednym z tych kierunków wartość tensora jest maksymalna, w drugim minimalna, w trzecim ekstremalna (maksymalna lub minimalna) w kierunku

prostopadłym do płaszczyzny wyznaczonej przez dwa pierwsze kierunki główne. U roślin będących w stanie turgoru, protoplast wywiera ciśnienie hydrostatyczne na ścianę komórkową, co całą komórkę czyni strukturą wstępnie naprężoną. Na poziomie tkanek i organów dodatkowo rolę tę spełnia naprężenie tkankowe (Hejnowicz i Sievers 1995ab, 1996a). Ciśnienie turgorowe jest izotropowe, tj. przyjmuje te same wartości w różnych kierunkach (rzędu 0.1-3 MPa), jednak wywołane nim naprężenie w ścianie komórkowej jest zwykle anizotropowe zależnie od kształtu komórki; jest izotropowe tylko w ścianie komórki sferycznej. Naprężenie w ścianie komórki sferycznej jest równe $\frac{rP}{2t}$, gdzie „*r*" oznacza promień komórki, „*t*" to grubość ściany, „*P*" to ciśnienie turgorowe. W komórce cylindrycznej stosunek naprężenia poprzecznego do podłużnego jest jak 2:1, jako, że naprężenie poprzeczne wynosi $\frac{rP}{t}$, a naprężenie podłużne wynosi $\frac{rP}{2t}$ przy założeniu, że komórka jest dostatecznie długa, tak aby zaniedbać wpływ końcowych ścian poprzecznych.

Odkształcenie ściany jest również tensorem drugiego rzędu. Zależy jednak nie tylko od tensora tego samego rzędu, jakim jest naprężenie, ale również od elastyczności czy podatności ściany, które są tensorami trzeciego stopnia. Biorąc pod uwagę to, że ściana komórkowa bardzo często złożona jest z wielu warstw (jest polilamellarna), przypuszcza się, że w poprzek ściany istnieje gradient odkształcenia; w najbardziej wewnętrznej warstwie (najmłodszej) odkształcenia nie ma lub jest bardzo niewielkie, podczas gdy najbardziej zewnętrzna warstwa (najstarsza) jest odkształcona maksymalnie. W poprzek ściany (prostopadle do powierzchni) istnieje gradient naprężenia turgorowego wynikający z faktu, że ściana nie jest nieskończenie cienka [Niklas 1992].

2.2. NAPRĘŻENIA TKANKOWE I ICH ROLA WE WZROŚCIE ORGANÓW ROŚLINNYCH

Z prostej obserwacji naciętych podłużnie połówek łodygi wyginających się na zewnątrz wynika, że naprężnie obecne jest nie tylko na poziomie komórek (wynikające z ciśnienia turgorowego), lecz występuje również na poziomie tkanek, stąd jego nazwa – naprężenie tkankowe. Hofmeister (1859, cytowane za Kutscherą 1989) jako pierwszy odnotował, że po izolacji z łodygi fragmenty tkanek zewnętrznych i wewnętrznych

zmieniają swoje wymiary; epiderma ulega skróceniu, tkanki wewnętrzne – wydłużeniu. Oznacza to, że tkanki te *in situ* znajdują się w stanie podłużnego naprężenia, odpowiednio, rozciągającego i ściskającego. Sachs (1865) na oznaczenie tych naprężeń wprowadził termin naprężenie tkankowe (Gewebespanung). Epiderma po wyizolowaniu z organu natury pędowej (łodyga, hypokotyl, liść) kurczy się nie tylko w kierunku podłużnym, ale również w kierunku poprzecznym; obserwacja ta, dokonana przez Gregory'ego Klaus'a (1867, cytowane za Kutscherą 1989), była dowodem na istnienie poprzecznego rozciągającego naprężenia tkankowego w epidermie. Rozkład naprężeń tkankowych jest odwrócony w przypadku korzenia: *(i)* podłużne nacięcie doprowadza do wygięcia przekrojonych połówek do środka; *(ii)* tkanki wewnętrzne po izolacji są dłuższe niż segment korzenia, z którego zostały wycięte (Sachs 1882, Pollock 1900 cytowane za Kutschera 1989).

Sachs (1865) postulował istnienie związku pomiędzy naprężeniem tkankowym i wzrostem organu, a również istnienie związku między sztywnością organu roślinnego a stanem naprężenia w jego tkankach niezależnie od naprężenia w ścianach wywoływanych bezpośrednio ciśnieniem turgorowym.

Naprężenie tkankowe (TS) określa się jako naprężenie występujące w tkance, której sztywność jest warunkowana turgorem i jest obecne tylko *in situ*; izolacja tkanek z organu prowadzi do zaniku naprężeń tkankowych w tych tkankach, wtedy pozostaje tylko naprężenie będące bezpośrednim skutkiem ciśnienia turgorowego (Hejnowicz i Sievers 1995a).

Stan rozciągnięcia jednej tkanki musi być zrównoważony ściśnięciem tkanki drugiej, w związku z czym, suma sił rozciągających ($F_{rozciąg}$) i ściskających ($F_{ścisk}$) we wszystkich tkankach w organie musi wynosić zero, czyli $F_{rozciąg} = - F_{ścisk}$. Rozciągające i ściskające TS może jednak osiągać bardzo różne wartości bowiem mimo równości sił, pola przekroju tkanek, na których te siły działają mogą się znacznie różnić. W hipokotylu słonecznika zmierzono wartości TS dla tkanek zewnętrznych (epidermy) i wewnętrznych (miękisz) (Hejnowicz i Sievers 1995b). Większość podłużnego naprężenia (TS_{long}) rozciągającego jest przenoszone przez epidermę (około 80%) i wynosi 2.5 i 2.3MN m^{-2} w odpowiednio górnej i dolnej części hipokotyla słonecznika. Podłużne rozciągające naprężenie tkankowe jest bardzo duże w porównaniu do poprzecznego naprężenia (TS_{trans}) rozciągającego (0.07 i 0.05MN m^{-2}). Naprężenia rozciągające w epidermie są równoważone przez naprężenia ściskające TS_{long} i TS_{trans} w wewnętrznym miękiszu, które wynoszą odpowiednio 0.15 i 0.43MN m^{-2}.

Z powyższych badań wynika, że TS występują zarówno w rosnących (górnych) jak i nierosnących (dolnych) obszarach hipokotyla. Ich występowanie nie jest uwarunkowane wzrostem. Według Hejnowicza i Sieversa (1996a) TS są wynikiem różnic modułów elastyczności tkanek w organie, którego komórki znajdują się w stanie turgoru. Tkanka o małych komórkach z grubymi ścianami komórkowymi charakteryzująca się dużym modułem elastyczności (epiderma, kolenchyma) jest naprężona rozciągająco, tkanka wewnętrzna (miękisz) z cienkościennymi komórkami o większych wymiarach i mniejszym module elastyczności jest naprężona ściskająco.

W organie naprężenie ścian komórkowych jest wypadkową naprężenia wynikającego bezpośrednio z turgoru (σ_{turg}) oraz naprężenia tkankowego (TS). W epidermie organu cylindrycznego podłużne naprężenie rozciągające jest maksymalne w kierunku podłużnym, z powodu dużego, podłużnego TS (prawie 3 razy większego niż σ_{turg} w tej tkance). Poprzeczne (obwodowe) naprężenie rozciągające jest stosunkowo niewielkie. Miękiszowa tkanka wewnętrzna znajduje się w stanie podłużnego naprężenia ściskającego. To naprężenie powoduje dodatkowe naprężenie rozciągające ściany komórek miękiszowych w kierunku obwodowym (poprzecznym). Poprzeczne TS w tkance wewnętrznej jest rozciągające; miękisz po wyizolowaniu z tkanki ulega zwężeniu i wydłużeniu (Hejnowicz i Sievers 1995b,1996a).

Naprężenie tkankowe może być czynnikiem umożliwiającym przekroczenie progu dla odkształceń plastycznych (z ang. yield threshold) czyli powodować wzrost (Hejnowicz i Sievers 1992, 1996b). Epiderma wyizolowana z organu nie wydłuża się, nawet gdy jest inkubowana w buforze o kwaśnym pH. Wartość progu dla odkształceń plastycznych jest na tyle wysoka, że naprężenie wynikające bezpośrednio z turgoru jest niewystarczające do inicjacji wzrostu wydłużeniowego. Wydłużanie izolowanej epidermy jest możliwe tylko po przyłożeniu odpowiedniego naprężenia rozciągającego, zastępującego TS występujące *in situ*, przy czym szybkość tego wzrostu jest zależna od pH roztworu inkubującego, bowiem wysokie pH hamuje wydłużanie izolowanej epidermy, nawet będącej w stanie naprężenia (Hejnowicz i Sievers 1992, 1996b).

2.3. ZNACZENIE EPIDERMY WE WZROŚCIE ORGANÓW ROŚLINNYCH

Już Kraus w roku 1867 nadał epidermie rolę nadrzędną w regulacji wzrostu łodygi, uważając zarazem, że tkanki wewnętrzne (miękisz) generują siłę napędową wzrostu łodygi. Epiderma, będąc swojego rodzaju „ogranicznikiem", reguluje szybkość wzrostu całego organu.

Odkształcenie epidermy zależy od ułożenia MF w ścianie, teoretycznie wydłużanie epidermy jest możliwe przy poprzecznie zorientowanych MF. Rzeczywiście, wiele badań wskazuje na to, że w młodych, szybko wydłużających się komórkach, ułożenie MF w najbardziej wewnętrznych warstwach ściany jest poprzeczne względem kierunku maksymalnego wzrostu, podczas gdy w starszych komórkach jest ono podłużne (Sauter *et al.* 1993).

Epiderma tworzy warstwę komórek bardzo ściśle do siebie przylegających, stąd też z punktu widzenia jej mechanicznych właściwości istotna jest rola blaszek środkowych spajających poszczególne komórki na ścianach antyklinalnych. Należy również zaznaczyć, że ściany epidermy nie są mechanicznie jednorodne: zewnętrze ściany są grubsze (nawet do 5 razy) niż wewnętrzne ściany i bardziej sztywne, stąd ich większa wytrzymałość na rozciąganie (Kutschera *et al.* 1987). Te ściany przenoszą większą część podłużnego rozciągającego naprężenia tkankowego. Zewnętrzne ściany komórkowe są też wyjątkowe pod względem anatomicznym, mają budowę helikoidalną (w konsekwencji – polilamellarną), w odróżnieniu do cienkich i jednowarstwowych ścian tkanek wewnętrznych (Kutschera 2000).

Kutschera (1994) zaproponował model wzrostu organu, w którym wyróżnia się epidermę (a w szczególności jej zewnętrzne ściany) jako strukturę ograniczającą, stąd i kontrolującą prędkość wzrostu całego organu. Epiderma jest uważana za miejsce reakcji na auksynę; usunięcie epidermy z segmentów hipokotyli znosi zdolność sekrecji protonów po podaniu auksyny. Fuzikokcyna nie jest jednak tkankowo-specyficzna (Mentze *et al.* 1977, Kutschera *et al.* 1987). Jednakże, nie wszystkie badania potwierdzają te koncepcje; z badań Clelanda i jego zespołu wynika, że tkanki wewnętrzne reagują na auksynę w podobnym stopniu co epiderma (Cleland 1991, Rayle *et al.* 1991).

3. MIKROTUBULE: BUDOWA, DYNAMIKA I ORGANIZACJA

3.1. BUDOWA MIKROTUBUL

Mikrotubule (MT) to polimery zbudowane z białek globularnych, którymi są cząsteczki tubuliny występujące jako dimery αβ. Cząsteczki α-tubuliny i β-tubuliny różnią się składem aminokwasów; podobieństwo sekwencji wynosi około 40%. W większości komórek eukariotycznych istnieje szereg izotypów αβ-tubuliny warunkowanych genowo lub będących wynikiem odwracalnych modyfikacji posttranslacyjnych, takich jak acetylacja, fosforyzacja, tyronizacja (McKean *et al.* 2001, Wang *et al.* 2004). Izotypy są tkankowo-specyficzne i mają różne własności, przez co mogą wpływać na budowę, funkcjonowanie MT oraz ich oddziaływanie z innymi białkami. Na przykład acetylacja α-tubuliny jest związana między innymi ze stabilnością MT tworzących aksonemy w rzęskach i wiciach.

Dimery αβ tubuliny łączą się ze sobą wiązaniami niekowalencyjnymi tworząc cylindryczną MT o średnicy zwykle około 25nm (Alberts *et al.* 1999). Ściana MT zbudowana jest ze słupów dimerów tubuliny zwanych protofilamentami, ułożonych równoległe do długiej osi MT, z różnym helikalnym układem cząsteczek α-tubuliny i β-tubuliny, należących do różnych protofilamentów. Najczęściej MT zbudowane są z 13 protofilamentów, liczba protofilamentów może się jednak zmieniać (od 9 do 15). Różna liczba protofilamentów częściowo odpowiada za zmienność średnicy MT. Zmienność średnicy MT jest jednak frapująca. W komórkach *Ornithogallum umbellatum* występują szczególne MT w agregatach ciałek lipidowych, zwanych lipotubuloidami (Kwiatkowska 1972) o większej średnicy (do 51nm) mimo, że liczba jednostek widocznych na ich przekroju poprzecznym jest nawet mniejsza (od 9 do 12) niż 13 (Kwiatkowska *et al.* 2006). Jeżeli te jednostki odpowiadają protofilamentom, oznaczałoby to istnienie MT z porozsuwanymi bocznie protofilamentami, stale jednak powiązanymi ze sobą tak, że tworzą MT.

Naprzemianległe ułożenie α-tubuliny i β-tubuliny determinuje polarność protofilamentów, jak i całej MT, co jest niezmiernie ważne z punktu widzenia dynamiki i funkcjonowania MT. Koniec z wyeksponowaną α-tubuliną i β-tubuliną nazywany jest odpowiednio końcem minus i plus.

Choć MT na schematach podręcznikowych przedstawiane są w postaci pustych cylindrów, oczywiście nie są puste. Analiza struktury tubuliny wykazała, że miejsce

wiązania między innymi taksolu znajduje się wewnątrz MT (Nogales *et al.* 1998). Wnętrze MT (przestrzeń luminalna) o średnicy około 17nm i długości 1-100μm jest miejscem, w których cząstki dyfundują z prędkością zależną od ich średnic oraz siły wiązań pomiędzy daną cząstką a wewnętrzną ścianą MT (Odde 1998). Z matematycznego modelu opracowanego dla tego procesu wynika, że cząsteczki tubuliny dyfundują przez MT stosunkowo szybko, w przeciwieństwie do taksolu, natomiast przeciwciała tubuliny, znajdujące się w przestrzeni luminalnej MT mogą być wiązane odwracalnie do ściany MT, co znacznie obniża prędkość ich dyfuzji. Takie właściwości MT można wykorzystać w medycynie. Mikrotubule mogłyby stanowić precyzyjne „dozowniki leków" zawierając substancje, które z różną szybkością będą uwalniane do komórki.

Mikrotubula jest strukturą wstępnie naprężoną; swobodna postać protofilamentu to nie prosty słup, ale łuk o dużej krzywiźnie, zamykający się w pierścień o średnicy ok. 36-40nm, ze stroną luminalną tubuliny po zewnętrznej stronie (Mandelkow *et al.* 1991). Łuki te widać na depolimeryzującym końcu plusowym (**Ryc.6**). Powierzchniowa warstwa MT jest więc rozciągnięta, luminalna zaś – ściśnięta. Pierścienie tubulin są jedną z form polimerów tubuliny. Pierścienie mogą się nakładać tworząc tubulę, jednak w stosunku do MT jest ona jakby „przenicowana" i bez naprężeń wstępnych charakterystycznych dla MT.

Niezmiernie interesująco przedstawiają się właściwości elektryczne MT. Na podstawie modelu opracowanego przez Nogales i współpracowników (1998) udało się obliczyć rozkład ładunków elektrycznych na powierzchni tubuliny (Stracke *et al.* 2002), jak i na całej MT (Baker *et al.* 2001). Teoretyczne rozważania wskazują na to, że podczas tworzenia się MT następuje zmiana rozkładu ładunków obecnych na niespolimeryzowanej tubulinie, w efekcie czego na powierzchni MT występuje negatywny potencjał elektryczny z niewielkimi tylko pozytywnymi obszarami. Stracke i współpracownicy (2002) empirycznie wykazali słuszność tych wyników, pokazując, że MT umieszczone w polu elektrycznym przemieszczają się w kierunku dodatniej elektrody. Właściwości elektryczne MT rzutują prawdopodobnie na ich wzajemne relacje, mogą również mieć swój udział w oddziaływaniach interakcjach z innymi białkami (motory, MAP, taksol itp.)

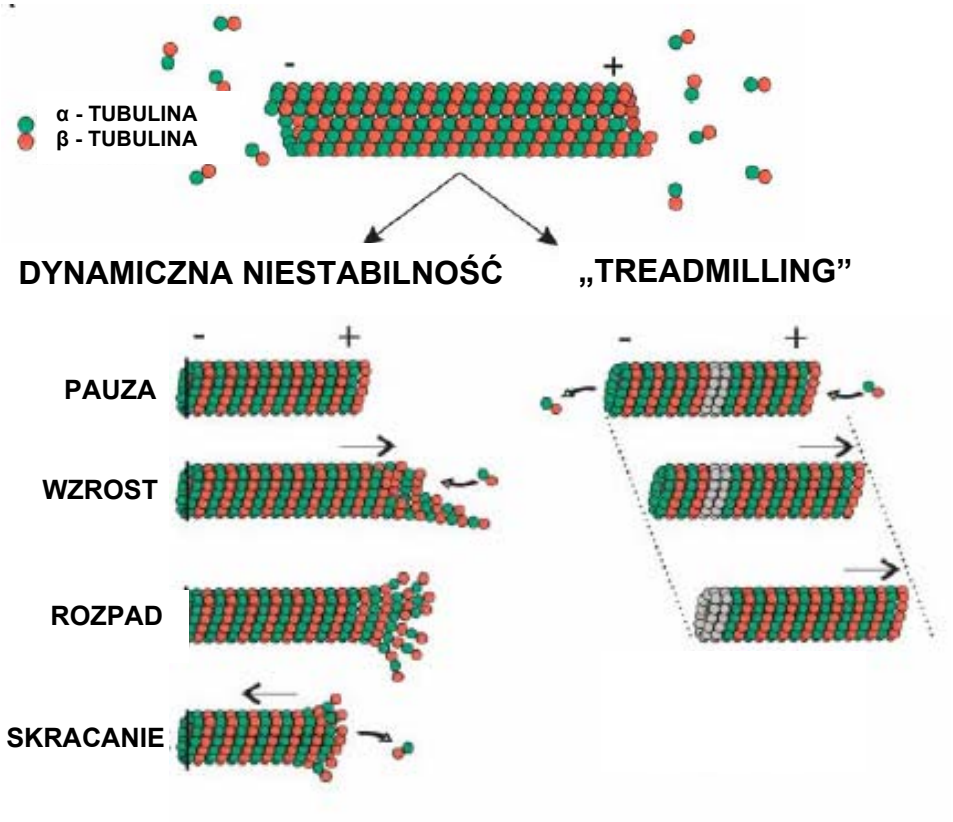
3.2. DYNAMIKA MIKROTUBUL

MT są strukturami niezwykle dynamicznymi (niejako w myśl maksymy Frey-Wyssling'a „ jedyną stałą cechą komórki jest jej ciągła zmiana"); mogą bardzo szybko ulegać polimeryzacji i depolimeryzacji, zmieniać swoje położenie (Lloyd i Chan 2004, Erhardt i Shaw 2006, Hashimoto i Kato 2006). Kluczową rolę w tych procesach odgrywa GTP, które połączone z tubuliną może bardzo szybko hydrolizować do GDP, co powoduje zmianę konformacji tubuliny i wpływa na siły wiążące cząsteczki tubuliny w MT. Koniec MT z wbudowanymi dimerami z GTP jest bardziej stabilny i ulega szybszemu wzrostowi (polimeryzacji) niż ten zawierający GDP. Gdy do końca plus MT dołączane są dimery z GTP z szybkością większą niż szybkość ich hydrolizy, wówczas koniec ten ulega wzrostowi. Gdy zaś z różnych przyczyn (na przykład mała szybkość polimeryzacji) w ścianie MT następuje hydroliza GTP do GDP, wtedy następuje odłączanie się dimerów i w efekcie skracanie MT. Oznacza to, że koniec plus posiada zdolność zarówno do wzrostu jak i skracania, jednakże wypadkowa tych dwóch procesów jest taka, że z reguły koniec ten jest miejscem wzrostu MT. Analogicznie koniec minus jest miejscem, gdzie przeważa odłączenie dimerów, wskutek czego MT ulega skracaniu.

W komórce zwierzęcej, gdzie koniec minus MT jest zakotwiczony w centrosomach, MT wykazują dynamiczną niestabilności i szczególny sposób przesuwania się MT zwany „treadmilling" (**Ryc. 6**). Dynamiczna niestabilność polega na wydłużaniu lub skracaniu się końców plus, przy czym przejście z jednej fazy do drugiej ma charakter stochastyczny. W przypadku, gdy z różnych przyczyn koniec minus MT nie jest zakotwiczony, wówczas oba końce MT są dynamiczne. Na końcu plus przeważa polimeryzacja, na końcu minus depolimeryzacja, co w rezultacie powoduje przemieszczanie się całej MT czyli jej „treadmilling". We fragmentach fibroblastów usunięcie centrosomów jest czynnikiem powodującym zmianę dynamiki MT z dynamicznej niestabilności na końcach plus na „treadmilling" (Rodionov *et al.* 1999). Mikrotubule mogą być również sporadycznie uwalniane z centrosomów w melanoforach i wędrować w kierunku obszarów peryferycznych komórki (Vorobjev *et al.* 1999).

U roślin organizacja MT jest inna niż u zwierząt. Z powodu braku centrosomów końce minus MT nie są zakotwiczone i możliwa jest migracja „wolnych" odcinków MT w obrębie komórki. Migracja ta zachodzi na zasadach podobnych do „treadmilling". Koniec plus wykazuje dynamiczną niestabilność, z przewagą procesów

doprowadzających do jego wzrostu, zaś koniec minus ulega powolnej depolimeryzacji i okresowi spoczynku (Shaw *et al.* 2003, Chan *et al.* 2003). Z powodu różnic w dynamice końców MT (koniec plus ulega dynamicznej niestabilności w odróżnieniu do końca minus) wynikające zachowanie określa się mianem „hybryd treadmilling". Zjawisko tego rodzaju obserwowano u większości badanych MT i wydaje się ono być uniwersalnym w świecie roślin sposobem na przemieszczanie MT w obrębie komórki.



Ryc.6. Dynamika mikrotubul: dynamiczna niestabilność i „treadmilling".
Dynamiczna niestabilność polega na stochastycznym przechodzeniu od fazy wzrostu (polimeryzacja) do fazy rozpadu i skracania (depolimeryzacja) końca plus MT i na odwrót. Koniec minus jest unieruchomiony (w centromerze). Możliwe są również okresy spoczynku (pauza), w których koniec plus nie wykazuje żadnej dynamiki.
„Treadmilling" polega na ciągłym wzroście końca plus i skracaniu się wolnego końca minus. Gdy szybkość wzrostu i skracania jest taka sama długość MT się nie zmienia a cały odcinek MT przemieszcza się w jednym kierunku (Dixit i Cyr 2004a, zmienione).

Innym mechanizmem przemieszczania się MT u roślin mógłby być ruch polegający na translokacji bocznej przy pomocy białek motorycznych lub ślizganiu się MT (wiązek) względem siebie (Lloyd 1994), jak ma to miejsce u zwierząt (Wang i Brown 2002, Baas *et al.* 2005) Jednakże ostatnie badania pokazują, że trajektoria migracji MT *in vivo* w obrębie warstwy korowej komórki roślinnej jest z reguły linią prostą (Shaw *et al.* 2003, Vos *et al.* 2003, Chan *et al.* 2003, Dixit i Cyr 2004b), stosunkowo rzadko obserwuje się niewielkie odchylenia (Shaw *et al.* 2003). Niezwykle

interesujący przypadek zaobserwowali Van Bruaene i współpracownicy (2005) badając *in vivo* MT podczas rozwoju włośnika. Zauważono, że odcinki MT, które wcześniej uległy znacznemu skróceniu odrastają, ale pod nieco innym kątem (ta różnica może wynosić od 2^0 do 11^0). Mógłby to być mechanizm, za pomocą którego następowałaby zmiana nachylenia MT a więc jej obrót: najpierw częściowa depolimeryzacja MT, następnie obrót krótkiego odcinka (łatwiej jest obrócić krótki odcinek niż dłuższy) i polimeryzacja.

3.3. POWSTAWANIE I ORGANIZACJA MIKROTUBUL W KOMÓRCE

Choć MT, przy wysokiej koncentracji wolnych dimerów tubuliny, mogą się same tworzyć (zjawisko często wykorzystywane do badań *in vitro*), to w komórce wymagają ośrodków inicjujących nukleację. Ośrodki te są prawdopodobnie kompleksami białek zawierającymi między innymi pierścienie γ-tubuliny, do których dołączane są dimery α-tubuliny i β-tubuliny. W komórkach zwierzęcych γ-tubulina zlokalizowana jest w centrosomach, które wraz z dodatkowymi białkami są jednocześnie miejscami nukleacji MT.

U zwierząt MT są przeważnie zakotwiczone swoimi końcami minus w centrosomach, końce plus wyrastają poza centrosom, tworząc układ radialny o jednolitej polarności. W niektórych komórkach (neurony) obserwuje się migrację odcinków MT wzdłuż komórki, prawdopodobnie przy pomocy białek motorycznych (Wang i Brown 2002). Zaproponowany przez Baas'a i współpracowników (2005) model („cut and run" model) wyjaśnia mechanizm tego zjawiska. Model zakłada, że zdolność MT do migracji jest odwrotnie proporcjonalna do ich długości, tylko odpowiednio krótkie odcinki mogą być przemieszczane. Tak więc komórka chcąc „zmobilizować" MT zakotwiczone w centrosomie, aktywuje białka „tnące" długie MT na krótkie odcinki, a te na zasadzie translokacji są przemieszczane poprzez białka motoryczne (patrz dalej) w dalsze obszary komórki.

Biorąc pod uwagę budowę MT (trzynaście podjednostek na obwodzie, każda z nich połączona z sąsiednimi), fragmentacja MT nie wydaje się być rzeczą łatwą. Są jednak białka, które posiadają taką zdolność - kataniny. Mechanizm „cięcia" MT przez te białka, które są jednocześnie ATP-azami, prawdopodobnie polega na zmianie ich konformacji po hydrolizie ATP. Prowadzi to do miejscowej destabilizacji połączeń między dimerami tubuliny, która następnie rozprzestrzenia się wokół całego obwodu MT (Quarmby 2000).

W komórkach roślinnych centrosomy nie występują. Ośrodki inicjujące nukleację MT w postaci cząsteczek γ-tubuliny (z dodatkowymi, nie poznanymi jeszcze białkami) są rozproszone w warstwie korowej cytoplazmy oraz na otoczce jądrowej (Joshi i Palevitz 1996). Pod koniec mitozy MT wyrastające z otoczki jądrowej zaczynają rozrastać się na zewnątrz i osadzają się w przyściennym pokładzie cytoplazmy (Westeneys 2002) tworząc układ kortykalny. Mikrotubule kortykalne (MTk) występują w postaci wiązek (zbudowanych z kilku krótkich, powiązanych ze sobą MTk), które często są wzajemnie równoległe i nachylone pod pewnym kątem w stosunku do osi komórki. Dokładniejsze badania wykazały, że w warstwie kortykalnej pierścienie γ-tubuliny są rozmieszczone wzdłuż MTk, a nowe MTk wyrastają na kształt odgałęzień (Shaw *et al.* 2003, Murata *et al.* 2005). Co ciekawe, kąt pomiędzy nowotworzonymi MTk i MTk „macierzystymi" jest ściśle określony, wynosi około 40^0. Jeśli nowe MTk są tworzone pod kątem, to w jaki sposób powstaje układ wzajemnie równoległych MTk, tak charakterystyczny dla komórek roślinnych? Shaw i współpracownicy (2003) zaobserwowali, że MTk rozchodzą się od miejsca ich inicjacji. Prawdopodobnie, mamy tutaj do czynienia z mechanizmem obserwowanym w komórkach zwierzęcych - MTk są cięte przez białka podobne do zwierzęcych katanin (Burk i Ye 2002). Przestrzenne oddzielenie MTk od ich miejsca nukleacji wydaje się być jednym z pierwszych warunków ich organizacji w układ równoległych wiązek. Badania mutanta *Arabidopsis*, w którym aktywność katanin jest zaburzona, wykazały obecność chaotycznie ułożonych MTk, co potwierdza udział katanin w procesie organizacji układu MTk (Burk *et al.* 2001, Burk i Ye 2002).

Kolejnym warunkiem byłoby wzajemne dopasowanie MTk. Niewątpliwie w procesie tym uczestniczą białka motoryczne i białka MAP, wpływając na specyficzne zachowanie się MTk.

Jak już wcześniej zaznaczono, dynamika poszczególnych MTk wydaje się mieć charakter stochastyczny, jednak oddziaływania zachodzące pomiędzy MTk mogą regulować w pewnym stopniu dynamikę i czynić ją przewidywalną. Wykorzystując techniki transformacji protoplastów *Nicotiana tabacum,* Dixit i Cyr (2004) obserwowali zachowanie MTk, gdy te napotykały na swej drodze migracji inne MTk. Okazało się, że kluczową rolę odgrywa kąt, pod którym koniec plus jednej MTk natknie się na drugą MTk. Gdy kąt styku jest płytki ($<40^0$), wówczas prawdopodobieństwo dopasowania się rosnącej MTk do orientacji napotkanej MTk (tworzenie wiązek) znacznie wzrasta. Gdy kąt styku jest większy ($>40^0$) wtedy bardziej prawdopodobnym jest, że rosnąca

MTk ulegnie depolimeryzacji. Podobne zjawisko zaobserwowali Van Bruaene i współpracownicy (2005) badając MTk podczas rozwoju włośników u *Arabidopsis*. Warty przypomnienia jest fakt, że kąt pod jakim rozgałęziają się nowotworzone MTk wynosi około 40^0 (Murata *et al.* 2005), czyli jest to graniczna wartość powyżej której, rozgałęziające się MTk z układu równoległego mogły by ulec destabilizacji na skutek „zderzenia" z MTk tego układu. Takie zachowanie się MTk oparte na modyfikacji ich dynamiki pod wpływem zderzeń, mogłoby przynajmniej częściowo tłumaczyć organizowanie się układu MTk.

3.4. BIAŁKA MAP

Pierwotnie, mianem białek MAP (białka towarzyszące MT, z ang. Microtubule Associated Protein) określano białka bezpośrednio wiążące się z MT, jednak pojęcie to rozszerzono i obecnie białkami MAP nazywa się również te, które pośrednio lub tylko czasowo są związane z MT lub będące homologami poznanych już białek MAP (Sedbrook 2004).

Podobną funkcję spełnia prawdopodobnie rodzina białek EB1 (z ang. End-Binding protein). W kulturze zawiesinowej *Arabidopsis* białko EB1a (AtEB1a) zostało zlokalizowane na MT w różnych fazach cyklu komórkowego: we wrzecionie mitotycznym i fragmoplaście w pobliżu biegunów (co odpowiada końcom minus MT), na MTk przy ich polimeryzujących końcach plus, jak również przy miejscach, z których MTk wyrastają (Chan *et al.* 2003). AtEB1a wydaje się więc być czynnikiem regulującym wzrost (polimeryzację) MT oraz brać udział w zakotwiczaniu MT do ich miejsca nukleacji. Dixit i współpracownicy (2006a) wykryli obecność EB1a i EB1b tylko przy końcach plus MT, co prawdopodobnie ma związek z niższym poziomem ich ekspresji.

Innym białkiem zaangażowanym w procesy związane z dynamiką MT jest SPIRAL1 (SPR1). Mutanty *spr1* posiadają niezwykle interesujący fenotyp: korzenie, hipokotyl i ogonki liściowe są charakterystycznie skręcone w prawo (Furutani *et al.* 2000). Obecność SPR1 wykryto w układzie MTk (Nakajima *et al.* 2004) oraz pierścieniu preprofazowym, fragmoplaście i wrzecionie mitotycznym, co więcej, podobnie jak EB1, SPR1 zostało zlokalizowane na końcach plus MTk (Sedbrook *et al.* 2004). Jednakże, sygnał świadczący o obecności SPR1 na końcu plus zanika, gdy MT ulega skracaniu. Wyniki te wskazują na udział SPR1 w regulacji dynamicznej

niestabilności MT, być może poprzez stymulację polimeryzacji lub hamowania depolimeryzacji.

Mutacja genu kodującego białko podobne do katanin AtKTN1 powoduje opóźnienie w przejściu MT z otoczki jądrowej do warstwy kortykalnej (Burk *et al.* 2001). W niektórych komórkach obserwowano radialnie ułożone MT wyrastające z otoczki jądrowej, które nie były widoczne w kontroli. Dodatkowo układ MTk był chaotyczny (Burk i Ye 2002). Przyjmuje się, że białko AtKTN1 powoduje uwolnienie MT z miejsca nukleacji poprzez ich „odcięcie" po zakończeniu podziału komórki oraz podczas interfazy. Zostało to potwierdzone przez badania *in vitro*: stabilizowane taksolem MT ulegają fragmentacji pod wpływem katanin (Burk i Ye 2002).

Mikrotubule podczas interfazy są powiązane między sobą tworząc wiązki. Wyizolowane z komórek *Daucus carota* białko o masie cząsteczkowej 65 kDa nazwane później MAP65 indukuje powstawanie wiązek pomiędzy równoległymi MTk (Chan *et al.* 1999).

Jedną z cech wyróżniających MTk jest ich połączenie z błoną komórkową. Połączenie to jest na tyle silne, że utrzymuje się pomimo różnych zabiegów preparacyjnych i może być regulowane przez szereg czynników (Akashi i Shibaoka 1991). Podłużne cięcie fragmentów korzeni *Zea mays* powoduje „otwarcie" komórek a pomimo tego układ MTk jest zachowany (Tian *et al.* 2004). Jednym z białek łączących MTk z błoną komórkową jest fosfolipaza D należąca do białek MAP (Dhonukshe *et al.* 2003*)*. Połączenie MTk z błoną jest niezbędne do organizacji całego układu. Aktywacja fosfolipazy przez n-butanol prowadzi do uwolnienia MTk z błony, ich fragmentacji i częściowej depolimeryzacji.

Kolejna kategorią białek MAP są białka motoryczne (motory), które hydrolizując ATP poruszają się wzdłuż MT w określonym kierunku (ku końcowi plus lub minus). Ich budowa jest charakterystyczna: globularna głowa zawierająca domeny do wiązania ATP i MT, oraz ogon, do którego przyłączane jest cargo. Białka motoryczne mogą transportować różne cząstki, pęcherzyki, organelle lub brać udział w organizacji układów MT, powodować ich ślizganie. Wyróżnia się dwie grupy motorów wiążących MT: *(i)* kinezyny i białka podobne do kinezyn (KRP, Kinesin-Related Protein), przemieszczające się w kierunku końca plus, oraz *(ii)* dyneiny przemieszczające się w kierunku końca minus. U roślin KRP uczestniczą w powstawaniu i funkcjonowaniu wrzeciona mitotycznego oraz fragmoplastu, czyli struktur, w których polarność MT jest ściśle określona (Azimzadeh *et al.* 2001, Lloyd

i Hussey 2001). Białka KRP wiążące się z MT zlokalizowano również w warstwie korowej komórek (Barroso *et al.* 2000, Zhong *et al.* 2002). Białko FRA1 (fragile fibers) jest prawdopodobnie pośrednikiem pomiędzy MTk a mikrofibrylami celulozowymi (MF), bowiem mutacja *fra1* związana jest z zaburzeniem układu MF w ścianie wtórnej przy niezmienionym ułożeniu MTk (Zhong *et al.* 2002). Białka podobne do kinezyn mogą być również zaangażowane w reorientację MTk podczas dojrzewania komórki; ich obecność wykryto we włóknach *Gossypium hirsutum* wzdłuż wiązek MTk na różnych etapach rozwoju (Preuss *et al.* 2003).

O tym jak istotną rolę pełnią białka motoryczne w organizowaniu się układów MT świadczą badania pokazujące, że *in vitro* z mieszaniny tubuliny, białek motorycznych i ATP powstają sieci MT, struktury wirowe oraz gwiaździste, których kształt zależy od koncentracji motorów, szybkości ich przemieszczania się oraz czasu wiązania z MT (Surrey *et al.* 2001). Choć wiry powstające z MT nie są obserwowane w komórkach, to pozostałe struktury MT tworzone *in vitro* przypominają układy MT w komórkach roślinnych i zwierzęcych: układy gwiaździste odchodzące od centrosomów, wiązki MTk, wrzeciona mitotyczne.

3.5. POLARNOŚĆ UKŁADÓW MIKROTUBUL KORTYKALNYCH

O ile u zwierząt polarność całego układu MT wynikająca z zakotwiczenia w centrosomach jest bezsporna (choć obecność centrosomów nie jest warunkiem koniecznym do wyodrębnienia się określonej polarności [Maly i Borisy 2002]), to w przypadku roślin zdania naukowców odnośnie polarności układu MTk są podzielone. Pierwsze badania polarności MTk wskazywały na to, że układ kortykalny złożony jest z MT o mieszanej (równoległej i antyrównoległej) polarności (Shaw *et al.* 2003, Chan *et al.* 2003, Tian *et al.* 2004, Vos *et al.* 2004). Jednak badania Dixit'a i współpracowników (2006a), wykorzystujących transgeniczne *Arabidopsis* z ekspresją białka EB1 połączonego z GFP (z ang. Green Fluorescent Protein), nie potwierdzają tego poglądu. Białko EB1 związane z GFP znakuje koniec plus MT, będąc jednocześnie znakomitym markerem pozwalającym na obserwację dynamiki MT *in vivo*. Analiza ilościowa i jakościowa doprowadziła do wniosku, że w około 70% komórek z równoległym układem wiązek MT, większość MTk odznacza się jednolitą polarnością, choć ta może być różna w sąsiadujących komórkach. W pozostałych 30% komórek, MTk były zgrupowane w domeny każda o określonej polarności. Określoną polarnością charakteryzują się również MTk we włośnikach korzenia *Arabidopsis*,

gdzie większość końców plus jest skierowana do wierzchołka włośników (Van Bruaene *et al.* 2005). Rozbieżności z wynikami wcześniejszych badaniań wynikają prawdopodobnie z braku dokładnej analizy ilościowej w poprzednich badaniach (Chan *et al.* 2003), jak i faktu, że część tych badań dotyczyła komórek izodiametrycznych z chaotycznym układem MTk, gdzie (co do tego jest zgodność), określona polarność nie występuje.

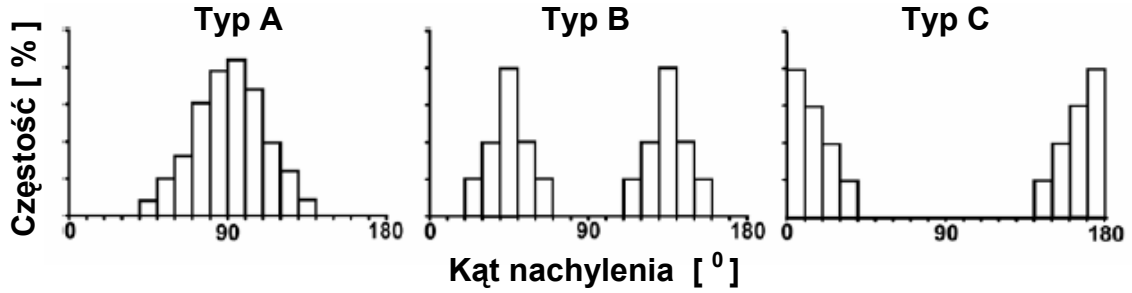
3.6. CYKLICZNA REORIENTACJA UKŁADÓW MIKROTUBUL KORTYKALNYCH W KOMÓRCE ROŚLINNEJ

Układ MTk, w którym wiązki są równoległe, pozostaje dynamiczny. W odpowiedzi na wiele czynników endo- i egzogennych orientacja układu, czyli nachylenie wiązek względem osi komórki, może się zmienić, czego wynikiem jest poprzeczny, skośny lub podłużny układ. Do tej pory opisano wpływ następujących czynników na reorientację MTk: regulatory wzrostu (Roberts *et al.* 1985, Shibaoka 1994), światło (Iwata i Hogetsu 1989, Zandomeni i Schopfer 1993, Ueda i Matsuyama 2000), naprężenie rozciągające i ściskające (Fischer i Schopfer 1997, 1998, Hejnowicz *et al.* 2000, Wymer *et al.* 1996), grawitacja (Nick *et al.* 1990, Himmelspach i Nick 2001), pole elektryczne (Hush i Overall 1991, Blackman i Overall 1995), procesy związane z rozwojem i różnicowaniem się komórek (Abe *et al.* 1995, Lang *et al.* 1982, Granger i Cyr 2001).

Niezależnie od działania wyżej wymienionych czynników, układ MTk ulega również „wewnętrznej" (autonomicznej) reorientacji. Pierwsze przesłanki pojawiły się w pracy przeglądowej Williamsona (1990), w której zwrócił uwagę na fakt, że w komórkach z polilamellarną ścianą komórkową (w której kąt nachylenia MF zmienia się w kolejnych warstwach), orientacja równoległych MTk jest różna w sąsiednich komórkach. Nasunęło to przypuszczenie, że orientacja MTk może ulegać cyklicznej zmianie a cykle te mogą być niesynchronizowane, czego efektem jest obserwowana różnorodność układów. W kolejnych badaniach analizowano zmiany orientacji MTk pod wpływem różnych regulatorów wzrostu w epidermie hipokotyla fasoli (Mayumi i Shibaoka 1996, Takesue i Shibaoka 1998). Zewnętrzne ściany komórkowe epidermy mają polilamellarną strukturę, z następującymi po sobie warstwami z podłużnie i poprzecznie ułożonymi MF, z czego może wynikać, że orientacja MTk również zmienia się cyklicznie. Wyniki badań wskazywały, że istotnie, efekt regulatorów wzrostu polega na modyfikacji istniejącego już cyklu reorientacji. Modyfikacja cyklów

wiąże się z ich synchronizacją, w wyniku czego obserwuje się nagromadzenie orientacji poprzecznych lub podłużnych w zależności od stosowanego regulatora.

Hejnowicz (2005) analizując rozkłady częstości występowania określonych orientacji w epidermie słonecznika doszedł do dalej idących wniosków, a mianowicie, że cykl autonomicznej reorientacji MTk ma najprawdopodobniej charakter rotacyjny - biegnie w jednym obrotowym kierunku, a nie na zasadzie oscylacyjnej zmiany kierunku. Histogram obrazujący częstość występowania danych orientacji układów MTk w różnych komórkach w jednym momencie można przetworzyć na zmianę orientacji układu w czasie w jednej komórce, przy założeniu asynchronii cyklów w różnych komórkach. Wyróżniono kilka rodzajów histogramów w zależności od położenia maksima, stopnia asymetrii (**Ryc.7**): typ A z maksimum w kierunku poprzecznym (tj. kąty około 90^0 względem długiej osi komórki), typ B z dwoma maksimami przy skośnej orientacji (około 45^0 i 135^0), typ C z maksimum w kierunku podłużnym (około 0^0 i 180^0). Histogramy mogą być asymetryczne zarówno w typie A jak i w typie B, gdy jedna z orientacji: Z (kąty około 45^0) lub S (około 135^0) przeważa. Taką różnorodność histogramów można uzasadnić rotacyjnym charakterem reorientacji, której prędkość zależy od kąta nachylenia układu. Każdemu z typów histogramów można przyporządkować określony typ reorientacji, i tak histogram typu A reprezentowałby typ cyklu, w którym następuje „przeskok" (tj.szybkość reorientacji jest największa) przez kierunek podłużny (czego wynikiem jest minimum na histogramie w tym zakresie kątów). W typie C, „przeskok" występuje przez kierunek poprzeczny, w typie B przez kierunek poprzeczny i podłużny. Wysunięto hipotezę, że czynniki modyfikujące układ MTk, jak gdyby powodujące reorientację, wpływają na szybkość ich autonomicznej reorientacji w cyklu rotacyjnym.



Ryc.7. Typy histogramów przedstawiających częstość występowania kątów, pod którymi nachylone są mikrotubule kortykalne względem długiej osi komórki.
W histogramie typu **A** maksimum występuje przy poprzecznej orientacji względem osi komórki; w typie **C** – przy podłużnej orientacji, w typie **B** występują dwa maksima przy skośnej orientacji.

Reorientacja cyklu na zasadzie rotacji tłumaczy w najprostszy sposób układy MTk, w których kąt nachylenia wiązek zmienia się wzdłuż komórki, tak, że następuje „odwrócenie" kąta (nazywanych „przejściami" z ang. transitions); orientacja Z zmienia się na S, lub na odwrót, stopniowo przechodząc przez kierunek podłużny lub poprzeczny; bądź też zmienia się nagle w sposób skokowy i wtedy występuje faza „przebudowy". Hejnowicz (2005) interpretuje to zjawisko, jako gradient fazy cyklu rotacji MTk wzdłuż komórki.

O tym, że rotacja układu MTk nie dotyczy wyłącznie epidermy hipokotyla słonecznika, a jest zjawiskiem powszechnym, może świadczyć występowanie „przejść" widocznych na fotografiach układów MTk we wcześniejszych publikacjach, choć nie interpretowanych jako przejawy rotacji MTk:, epiderma koleoptyla kukurydzy (Nick *et al.* 1990), epiderma hipokotyla *Arabidopsis* (Ueda i Matsuyama 2000, Le *et al.* 2005), włóknach łodygi *Arabidopsis* (Zhong *et al.* 2002). Również nieopublikowane badania własne nad MTk w epidermie liści tulipana potwierdzają rotacyjny cykl reorientacji MTk.

Udokumentowano różnorodność kątów nachylenia układów równoległych MTk w komórkach będących w bliskim sąsiedztwie (Mayumi i Shibaoka 1996, Zandomeni i Schopfer 1993, Baskin *et al.* 2004, Buschmann *et al.* 2004), co można intepretować jako przejaw asynchronii cyklu reorientacji MTk

Zastosowanie techniki transformacji roślin GFP umożliwiło obserwacje *in vivo* rotacji układu MTk w epidermie hipokotyla *Arabidopsis* (Chan *et al.* 2007). Równolegle ułożone wiązki MTk rotują z szybkością różną w różnych komórkach; czas potrzebny na wykonanie pełnego obrotu przez cały układ MTk może wynosić od 3 do 13h. Autorzy podają, że gdy komórki przestają rosnąć MTk „zastygają' w orientacji podłużnej lub stromej.

Badania *in vivo* reorientacji MTk będącej wynikiem działania światła (Ueda i Matsuyama 2000), grawitacji (Himmelspach *et al.* 1999), zranienia (Yuan *et al.* 1995) lub endogennych procesów związanych ze wzrostem (Granger i Cyr 2001) nie falsyfikują hipotezy o rotacyjnym charakterze reorientacji. W żadnym z obserwowanych przypadków reorientacja układu nie polegała na całkowitej depolimeryzacji układu poprzedniego i polimeryzacji w układ nowy. Proces reorientacji był stopniowy. W niektórych przypadkach był związany z pojawieniem się kilku pojedynczych wiązek w innej orientacji i stopniowym dopasowywaniem reszty układu do nowej orientacji. Reorientacja obserwowana *in vivo* może zachodzić albo zgodnie

z kierunkiem ruchu wskazówek zegara, albo w kierunku przeciwnym. Obserwowano zmianę kierunku przy obserwacji układu MTk jednej i tej samej komórki. Również analiza układów MTk z „przejściami" na materiale utrwalonym prowadzi do wniosku, że w tej samej komórce mogą występować rotacyjne reorientacje w obu kierunkach (badania własne).

4. UDZIAŁ MIKROTUBUL KORTYKALNYCH W MORFOGENEZIE

W roku 1962, przed odkryciem MT, Paul B. Green stwierdził, że traktowanie komórki *Nitelli* kolchicyną, która znana była jako substancja zaburzająca wrzeciono mitotyczne, powoduje dezorganizację układu MF, prowadząc do zmiany kształtu całej komórki z cylindrycznego na sferyczny. P.B.Green przewidział istnienie wydłużonych struktur białkowych w kortykalnej cytoplazmie, podobnych do włókien wrzeciona mitotycznego. Te „białka cytoplazmatyczne" zlokalizowane w warstwie korowej miały kontrolować kierunek odkładania się MF, a przez co i kształt całej komórki. Dodatkowo, orientacja „białek cytoplazmatycznych" wydawała się być zależna od odkształcenia. Rok później Ledbetter i Porter (1963) przy użyciu mikroskopii elektronowej odkrywają MTk w cytoplazmie, których układ odpowiada układowi MF celulozowych w ścianie. Uzupełnieniem hipotezy zaproponowanej przez Green'a (1962) jest stwierdzenie, że w relacjach układ MTk – układ nowotworzonych MF - ukierunkowanie wzrostu istnieją sprzężenia zwrotne (Williamson 1990, 1991, Fisher i Cyr 1998, Zandomeni i Schopfer 1993, 1994, Fischer i Schopfer 1997,1998). Dany układ MTk warunkuje układ nowotworzonych MF, ten warunkuje ukierunkowanie wzrostu komórki. Wzrost jako odkształcenie nieodwracalne ściany wpływa bezpośrednio na układ MTk. Dodatkowo MTk zmieniają swoją orientację pod wpływem różnych czynników takich jak światło, hormony, naprężenie. Układ nowo tworzonych MF zależy nie tylko od układu MTk (na przykład może być samoskładany, jak w przypadku układu helikoidalnego), a ukierunkowanie wzrostu zależy nie tylko od układu MF, ale również od takich czynników jak anizotropia naprężenia, działanie ekspansyn. Odkrycia te otworzyły drogę całej serii projektów badawczych mających na celu wyjaśnienie związku pomiędzy układem MTk, MF wzrostem i kształtem komórek.

4.1. WPŁYW WZROSTU (ODKSZTAŁCENIA PLASTYCZNEGO ŚCIANY) NA UKŁAD MIKROTUBUL KORTYKALNYCH. HIPOTEZA SCHOPFERA

Wiadomo, że MTk zmieniają swój układ pod wpływem różnych czynników zarówno endo- jak i egzogennych. Ogólnie czynniki te można podzielić na te, których efektem jest poprzeczna (względem długiej osi komórki) orientacja MTk oraz te, których efektem jest podłużna orientacja. Do pierwszej grupy czynników należy auksyna (Zandomeni i Schopfer 1993), giberelina (Lloyd *et al.* 1995), podłużne pole elektryczne (Blackman i Overall 1995), podłużne naprężenie rozciągające (Zandomeni i Schopfer 1994, Fischer i Schopfer 1997). Natomiast czynniki, które wywołują układ podłużny to cytokininy i kwas abscysynowy (Shibaoka 1994), etylen (Roberts *et al.* 1985), światło niebieskie (Laskowski 1990, Nick *et al.* 1990), podłużne naprężenie ściskające (Zandomeni i Schopfer 1994, Fischer i Schopfer 1997).

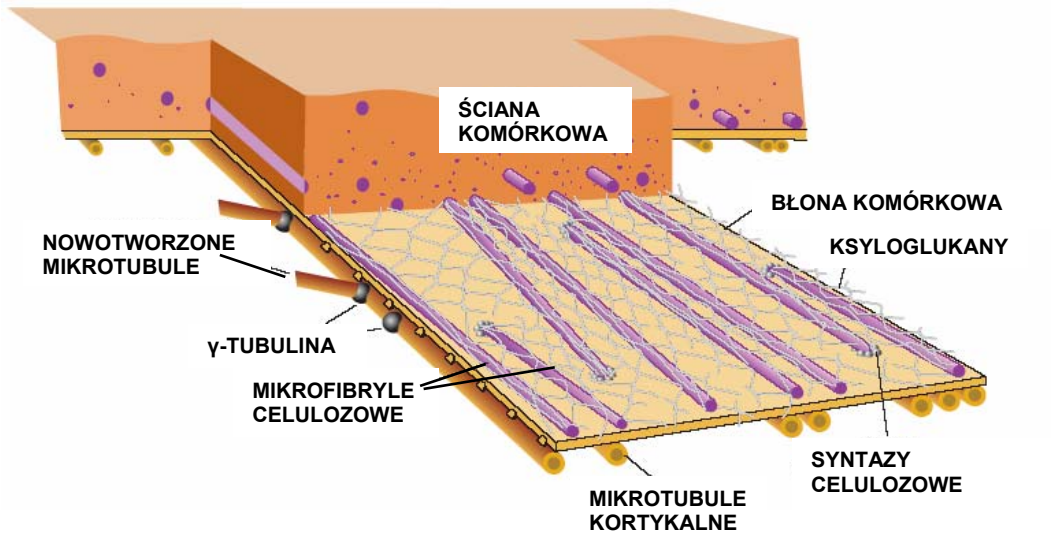
Schopfer i współpracownicy (Zandomeni i Schopfer 1993, 1994, Fischer i Schopfer 1997, 1998) zauważyli, że czynniki związane z poprzeczną orientacją MTk zwiększają szybkość elongacji, podczas gdy związane z podłużną orientacją - hamują elongację. Układ poprzeczny byłby wtedy charakterystyczny dla komórek ulegających elongacji, podłużny zaś dla komórek, które nie wydłużają się. Wysunięto więc hipotezę, że wpływ czynników takich jak światło, regulatory wzrostu czy naprężenie na układ MTk jest pośredni. To wzrost będący odkształceniem plastycznym (a właściwie jego szybkość), wynikający z działania powyższych czynników, wpływa bezpośrednio na układ MTk. Mikrotubule kortykalne poprzez receptory znajdujące się prawdopodobnie w błonie odbierają kierunkowe informacje o odkształceniach plastycznych i względem nich zmieniają swą orientację (Fischer i Schopfer 1998). Kierunek ułożenia MTk byłby więc prostopadły do kierunku maksymalnego wzrostu. Na poparcie tej hipotezy grupa Schopfera przedstawiła wyniki badań, w których ten sam czynnik, w zależności od tego jaki ma wpływ na szybkość wydłużania, indukuje różną orientację MTk. Jednogodzinne naświetlanie światłem czerwonym koleoptyli kukurydzy, które prowadzi do zwiększenia szybkości ich wydłużania, powoduje poprzeczny układ MTk (Zandomeni i Schopfer 1993). Dłuższe naświetlanie (1-2 godziny), hamujące wydłużanie koleoptyli powoduje podłużny układ. Gdy podawano auksynę na „świeżo" wygięte segmenty koleoptyli, obserwowano podłużny układ MTk po stronie wewnętrznej (wklęsłej) zgięcia, w której wskutek ściśnięcia, szybkość wydłużania była niewielka, oraz poprzeczny układ MTk po stronie wypukłej (rozciągniętej), wydłużającej się ze znacznie większą szybkość (Fischer i Schopfer 1997). Podobny rozkład orientacji MTk

obserwowano w wygiętych fototropicznie i grawitropicznie organach, tj. odpowiednio poprzeczna i podłużna orientacja występowała w części rozciągniętej i ściśniętej wygięcia (Nick *et al.* 1990).

Jednakże należy przypomnieć, że istnieją dane, które wskazują, że pewne czynniki mogą wpływać na układ MTk bez udziału wzrostu. W protoplastach *Nicotiana tabacum* poddanych działaniu siły odśrodkowej i naprężaniu zmiana układu MTk wystąpiła bez widocznego ich odkształcenia plastycznego (Wymer *et al.* 1996, Fisher i Cyr 2000). W segmencie epikotyla fasoli reorientacja układu w epidermie z podłużnego na poprzeczny po dodaniu auksyny dokonała się bez zauważalnych zmian w szybkość wydłużania (Takesue i Shibaoka 1999).

4.2. WPŁYW MIKROTUBUL KORTYKALNYCH NA UKŁAD MIKROFIBRYLI CELULOZOWYCH I NA ODWRÓT

Ogólny pogląd głosi, że regulacja wzrostu przez MTk odbywa się za pośrednictwem układu MF (**Ryc.8**).



Ryc. 8. Model przedstawiający zależność pomiędzy kompleksami enzymów syntetyzujących celulozę (syntazy celulozowe), mikrofibrylami celulozowymi, błoną komórkową i mikrotubulami kortykalnymi. Mikrotubule kortykalne są połączone z błoną komórkową, wzdłuż nich znajduje się γ-tubulina, będąca miejscem nukleacji nowych mikrotubul. Mikrotubule kortyklane poprzez oddziaływanie na syntazy celulozowe determinują kierunek odkładania nowotworzonych mikrofibryl celulozowych. W ścianie komórkowej mikrofibryle celulozowe są połączone ksyloglukanami (Wasteneys 2004, zmienione).

Obserwacja układu MTk w cytoplazmie odpowiadającego układowi MF w wewnętrznej warstwie ściany (Staehelin i Giddings 1982), doprowadziła do sformułowania dwóch hipotez próbujących wytłumaczyć zależność pomiędzy tymi dwoma strukturami. Hipoteza pośredniego wpływu zakłada, że syntazy celulozy poruszają się na błonie komórkowej niejako „o własnych siłach" generowanych przez

polimeryzację glukozy na końcu MF związanym z kompleksem syntazy. Rola MTk sprowadzała by się jedynie do tworzenia „torów" między którymi syntazy migrują (Heath 1974, cytowane za Lloyd 2006). Hipoteza bezpośredniego wpływu zakładała, że syntazy celulozy są bezpośrednio połączone z MTk poprzez białka motoryczne generujące jednocześnie siłę napędową dla ruchu syntaz.

Dodatkowym czynnikiem dla orientacji nowotworzonych MF może też być matryca z wcześniej utworzonych MF (Baskin 2001). Tym sposobem orientacja MF byłaby kontrolowana w dwójnasób: poprzez informacje pochodzące ze ściany komórkowej (istniejący już pokład MF) lub/i z wnętrza komórki (MTk). Hipoteza Baskina wydaje się jednak mało prawdopodobna odkąd pokazano, że dezorganizacja układu MF za pomocą DCB (2,6-dichlorobenzonitryl) oraz zaburzenie układu MTk w mutancie *mor1* w korzeniu *Arabidopsis* nie zapobiegają tworzeniu się zorganizowanego, poprzecznego względem długiej osi organu układu MF (Himmelspach *et al.* 2003). W tym przypadku organizowanie się MF jest niezależnie zarówno od matrycy w ścianie jak i układu MTk. Alternatywne hipotezy próbują wyjaśnić proces formowania się ściany bez udziału MTk. We włośnikach *Limnobium stoloniferum* i *Equisetum hyemale* obserwowano, że układ MTk był zawsze równoległy do długiej osi komórki w części nierosnącej włośnika, podczas gdy nachylenie MF zmieniało się w sposób rotacyjny w kolejno tworzonych warstewkach (lamellach) ściany (Emons *et al.* 1992). Emons i jej współpracownicy nie są jednak zwolennikami poglądu, że helikoidalna struktura wynika z samoskładania się, jak się to przyjmuje w tworzeniu ciekłego kryształu typu cholesterycznego. Emons i Mulder (2000) opracowali model dla tworzenia helikoidalnej ściany, w którym kąt nachylenia MF jest determinowany gęstością ich rozmieszczenia oraz geometrią komórki. Warto podkreślić, że samoskładanie się hemiceluloz w cholesteryczny ciekły kryształ, jakim jest ściana o strukturze helikoidalnej, jest stale niedostatecznie uwzględniane w badaniach komórek roślinnych.

Hipoteza wpływu MTk na układ MF zakłada prostą relację ułożenia tych dwóch polimerów, jednak liczne wyjątki wydają się wskazywać na bardziej złożoną relację. W korzeniu *Zea mays* obserwowano poprzeczny układ MTk i MF, jednak przy orientacji skośnej odpowiedniość nie zawsze występuje (Baskin *et al.* 1999, Sugimoto *et al.* 2000); co więcej chiralność układów MT i MF często jest przeciwna (lewoskrętny, tj. typu S układ MTk i prawoskrętny, tj. typu Z układ MF), [Baskin *et al.* 1999].

Obecność ściany komórkowej w protoplastach tytoniu zwiększa stabilność MTk w niskiej temperaturze (Akashi i Shibaoka 1991). W protoplastach tytoniu, które były traktowane izoxabenem, inhibitorem syntezy cellulozy, układ MTk ulega dezorganizacji (Fisher i Cyr 1998). Izoxaben nie powoduje jednak depolimeryzacji MTk sam przez się. Można więc wnioskować, że źródłem sygnału dla organizacji MTk są MF. Również inny inhibitor syntezy celulozy DCB (2,6-dichlorobenzonitryl) w korzeniach *Arabidopsis* powoduje zmiany w układzie MTk: zwiększa rozrzut kątów nachylenia wokół poprzecznej orientacji (Himmelspach *et al.* 2003).

Prostą relację pomiędzy MTk a MF podważają również inne badania. Mutant *mor1 Arabidopsis* w normalnych warunkach jest praktycznie nierozróżnialny od typu dzikiego, jednak jego hodowla w temperaturze powyżej 28^0 C prowadzi do poważnych zmian w układzie MTk: MTk są krótkie i nie tworzą równoległych wiązek (Whittington *et al.* 2001). Zaburzenia te nie zmieniają jednak ułożenia MF; pozostaje ono poprzeczne w strefie elongacyjnej korzenia (Sugimoto *et al.* 2003). Mimo to komórki zwiększają szybkość wzrostu w kierunku poprzecznym, tj. ulegają radialnemu „pęcznieniu" (z ang. radial swelling). Wydaje się więc, że zorganizowany układ MTk nie jest warunkiem koniecznym dla orientacji układu MF, ale zdezorganizowany układ MTk może zmienić MF pod innymi względami niż ich orientacja.

Układ MF zależy od funkcjonowania syntaz celulozowych. Korelację pomiędzy zawartością celulozy a prawidłową organizacją MF stwierdzono u mutanta *fra2* (z ang. fragile fiber) *Arabidopsis*; zmniejszeniu zawartości celulozy towarzyszyło zaburzenie w organizacji MF (Burk *et al.* 2001, Burk i Ye 2002). U poprzednio omawianego mutanta *mor1*, u którego w temperaturze powyżej 28^0C układ MTk ulega zaburzeniu ale zachowywany jest układ nowotworzonych MF, poziom celulozy nie ulega zmniejszeniu (Sugimoto *et al.* 2003).

W omawianych poprzednio badaniach rozpatrywano tylko ścianę pierwotną. Warto wziąć pod uwagę to, że układ MTk odpowiada ściśle układowi MF we wtórnej ścianie podczas różnicowania się elementów trachealnych z komórek mezofilu *Zinnia* (Mao *et al.* 2006). Tworzą się wówczas charakterystyczne zgrubienia ściany, a MTk widoczne są w postaci grubych wiązek.

W omówionych badaniach stosowano techniki mikroskopii elektronowej i polaryzacyjnej na utrwalonym materiale. Badania te nie dostarczały dowodu rozstrzygającego o udziale MTk w procesie tworzenia się ściany komórkowej. Taki dowód dostarczyły jednak badania Parenez'a i współpracowników (2006), w których

możliwe było jednoczesne śledzenie torów ruchu syntazy celulozowej i MTk w żywych komórkach. Porównanie obszarów występowania i migracji syntaz z ustawieniem MTk ujawniło ścisłą zależność w czasie i przestrzeni: tor ruchu syntaz (dwukierunkowy!) odpowiadał położeniu MTk nie tylko przy ich regularnym, poprzecznym ułożeniu. Również wzdłuż pojedynczych, nieuporządkowanych (z ang. discordant) MTk wykrywano migrujące syntazy, a zmianie układu MTk z poprzecznego na podłużny pod wpływem światła niebieskiego towarzyszyła podobna zmiana w torze ruchu syntaz. Interesującym jest, że MTk wykazywały większą dynamikę niż syntazy cellulozy; wielokrotnie obserwowano, że pomimo depolimeryzacji MTk, syntaza kontynuowała migrację (przez około 4 minuty) bez zmiany kierunku, co sugeruje, że polimeryzacja celulozy *per se* jest siłą napędową ruchu syntetaz w błonie. Paredez i współpracownicy (2006) pokazali, że o ile obecność MTk ściśle determinuje tory migracji syntaz, to w przypadku braku MTk, ruch syntetaz przynajmniej w pewnym stopniu nie jest przypadkowy. Odkrycie to może tłumaczyć wyniki badań, w których nie wykryto bezpośredniej zależności pomiędzy MTk i MF (Himmelspach *et al.* 2003, Sugimoto *et al.* 2003), oraz stanowić poparcie dla hipotez samoorganizacji układu MF.

4.3. WPŁYW MIKROTUBUL KORTYKALNYCH NA ANIZOTROPIĘ WZROSTU KOMÓREK ROŚLINNYCH

Faktem jest, że MTk biorą udział w wyznaczaniu kierunku, w którym szybkość wzrostu jest największa. W protoplastach tytoniu układ MTk jest poprzeczny w stosunku do osi elongacji (Wymer *et al.* 1996, Fisher i Cyr 1998, 2000). W młodych, rosnących komórkach *Nitella* obserwuje się również poprzeczne względem długiej osi komórki ułożenie MTk (Kropf *et al.* 1997), podobnie zresztą jak w częściach apikalnych korzenia (Baskin *et al.* 1999) lub hipokotyla (Hejnowicz *et al.* 2006).

Jakiekolwiek zaburzenia w strukturze MTk lub ich funkcjonowaniu spowodowane przez czynniki chemiczne (oryzalina, propyzamida, taksol) lub genetyczne (mutacje genów związanych z MTk) znajdują odzwierciedlenie w zmianie anizotropii wzrostu (Sugimoto *et al.* 2003, Baskin *et al.* 2004). Najczęściej komórki pochodzące z epidermy hipokotyla, liścia, korzenia, w charakterystyczny sposób „pęcznieją", co wiąże się z utratą ukierunkowanego wzrostu. Co ciekawe, mutacje w genach związanych z aktyną lub zaburzenia cytoszkieletu aktynowego przez odpowiednie substancje (cytochalazyna D, latrunkulina, faloidyna) powodują zahamowanie lub spowolnienie wzrostu komórek ale bez większej zmiany w ich

kształcie (Mathur i Hülskamp 2002, Mathur 2004). Okazuje się, że mikrofilamenty aktynowe wyznaczają szlaki, po których poruszają się pęcherzyki sekrecyjne i organelle, w przeciwieństwie do komórek zwierzęcych, gdzie rolę taką odgrywają raczej MTk (Kost i Chua 2002). U roślin współdziałanie MTk i mikrofilamentów aktynowych jest niezbędne do wzrostu jako procesu, który prowadzi do powiększania komórek i uzyskania określonego kształtu. MTk byłyby odpowiedzialne za „jakość" wzrostu (wyznaczenie kierunku, w którym wzrost jest maksymalny), cytoszkielet aktynowy za jego „ilość" (poprzez wpływ na transport substratów). Nie wyklucza się jednak możliwości, iż w pewnych przypadkach MTk mogą spełniać dodatkową rolę we wzroście. Gen *fra2* u *Arabidopsis* koduje białko podobne do katanin (AtKTN1), którego mutacja, oprócz szeregu morfologicznych zaburzeń, powoduje obniżenie zawartości celulozy i hemicelulozy w ścianie (Burk *et al.* 2001). Pozwala to przypuszczać, że MTk również biorą udział w biosyntezie niecelulozowych składników ściany poprzez transport pęcherzyków sekrecyjnych.

Wasteneys (2004) zaproponował hipotezę wyjaśniającą udział MTk i MF w ukierunkowanym wzroście. Według tak zwanej hipotezy „regulacji długości MF" (z ang. microfibril-length-regulation hypothesis) MTk wpływają na długość odkładanych MF. W normalnych warunkach kierunek ułożenia MTk i kierunek syntezy celulozy jest taki sam, co generuje powstanie długich MF. Układ, w którym MF są długie i zorientowane poprzecznie względem długiej osi komórki, determinuje kierunek wzrostu prostopadle do ułożenia MF. Zaburzenia układu MTk (rozpad równoległych wiązek, depolimeryzacja) powodują powstawanie krótkich MF, ale ogólnie orientacja MF może być zachowana. Poprzez tworzenie się na MF słabych punktów, które na skutek naprężenia są rozrywane, lub poprzez bezpośredni wpływ na aktywność syntaz celulozy, krótkie MF, nawet przy poprzecznym ułożeniu nie zapobiegają wzrostowi na szerokość, prowadząc tym samych do obniżenia anizotropii wzrostu.

4.4. MIKROTUBULE KORTYKALNE, CHIRALNOŚĆ I WZROST SPIRALNY

Chiralność (*chier* z greckiego oznacza ręka) to właściwość obiektu, polegająca na tym, że nie pokrywa się on ze swoim odbiciem lustrzanym, tak jak lewa i prawa ręka. Chiralne są cząsteczki niektórych związków chemicznych i wtedy wykazują aktywność optyczną, czyli skręcają płaszczyznę polaryzacji światła o pewien, charakterystyczny dla danej substancji kąt w prawo (forma D) lub w lewo (forma L). Aktywność taką przejawiają między innymi aminokwasy, przy czym wszystkie

aminokwasy budujące białka są formami L; monocukry zaś są formami D. Oznacza to, że chemiczne i biologiczne właściwości cząsteczek zależą nie tylko od ich składu atomowego lecz również od tego w jaki sposób te atomy są ułożone w przestrzeni. Określoną chiralnością odznaczają się cząsteczki RNA i DNA. Chiralność jest dość powszechna na wyższym poziomie organizacji: chiralne są MT, wiele ścian komórkowych, większość komórek, organów i organizmów.

Układy MTk, w których wiązki są równoległe względem siebie i nachylone skośnie do osi komórki, mogą tworzyć prawoskrętną (typu Z) lub lewoskrętną (typu S) helisę. W korze korzenia *Zea mays* i *Arapidopsis* układy MTk o określonej chiralności występują w określonym obszarze lub określonej fazie rozwoju: począwszy od merystemu, MTk są najpierw poprzeczne, następnie są skośne typu S, potem podłużne, i w końcu skośne typu Z (Liang *et al.* 1996; Baskin *et al.* 1999). Przewaga układów MTk typu Z występuje również w epidermie hipokotyla *Helianthus annus* w obszarze bazalnym (35-45mm od węzła liścieniowego), przy czym w wyżej położonych obszarach typy S i Z występują z podobną częstością (Burian 2006). Badania koleoptyli *Zea mays* i hipokotyli dzikich form *Arabidopsis* nie ujawniły podobnych zależności (Nick *et al.* 1990; Fischer i Schopfer 1998; Buschmann *et al.* 2004). Określony typ chiralności układu MTk może towarzyszyć mutacjom genów tubuliny lub białek MAP. Najczęściej takie mutacje mają swe poważne konsekwencje w fenotypie całej rośliny.

Komórki epidermy hipokotyla lub ryzodermy w formie dzikiej *Arabidopsis* tworzą kolumny mniej więcej równoległe do długiej osi organu. Istnieje jednak szereg mutantów, w których kolumny komórek są skręcone w określoną stronę; często również i liście w rozetkach oraz płatki kwiatów są skręcone w tę samą stronę. Gdy kierunek, w którym wzrost jest maksymalny tworzy helisę wokół danego organu, wówczas wzrost taki nazywamy helikalnym lub spiralnym.

Jako pierwsze zostały wyizolowane mutanty *spr (spiral)*, które charakteryzowały się redukcją anizotropii wzrostu (poprzez zwiększenie szybkości wzrostu radialnego) komórek endodermy i kory w korzeniu oraz hipokotylu, prawostronnym (typu Z) skręceniem epidermy i ryzodermy (Furutani *et al.* 2000). W mutancie *spr2* (gen SPR posiada dwa loci) dodatkowo występowało skręcenie liści i płatków przeciwnie do ruchów wskazówek zegara (na powierzchni organu daje to skręt typu Z). Co ciekawe, układ MTk w ryzodermie był skośny typu S; dla porównania w tym samym obszarze w formie dzikiej MTk były poprzeczne. Innym prawoskrętnym

mutantem jest *tor (tortifolia)*, który we wczesnych etapach rozwoju jest praktycznie nierozróżnialny od typu dzikiego, dopiero po 5 dniach od kiełkowania, epiderma hipokotyla ulega skręceniu na prawo, czemu towarzyszy lewoskrętny (typu S) układ MTk (Buschmann *et al.* 2004). Podobne, jak u mutanta *spr,* skręcenie, ale w przeciwną stronę, obserwowano u mutanta *lefty*: epiderma i ryzoderma były skręcone w lewo. W tę samą stronę były skręcone liście i płatki a układ MTk był typu Z (Thitamadee *et al.* 2002).

Szczegółowe badania wykazały, że wyżej wymienione mutacje dotyczą genów pośrednio lub bezpośrednio związanych z MT. Produkt genu TOR zlokalizowano na MT i zaklasyfikowano jako białko MAP (Buschmann *et al.* 2004); geny SPR kodują białka koncentrujące się na końcu plus MT, gdzie prawdopodobnie zaangażowane są w procesy związane z polimeryzacją (Nakajima *et al.* 2004, Sedbrook *et al.* 2004). Mutacje *lefty* są wynikiem wymiany pojedynczego nukleotydu w genach kodujących α-tubulinę (Thitamadee *et al.* 2002). Wszystkie te mutacje zmieniają prawdopodobnie dynamikę i funkcjonowanie MT, czego wynikiem są skośne układy MTk o ściśle określonej chiralności.

Mocnym argumentem przemawiającym za tą hipotezą jest fakt, że traktowanie roślin substancjami wpływającymi na dynamikę MTk zmienia chiralność ich układu. W wysokich koncentracjach taksol stabilizuje MTk zapobiegając ich depolimeryzacji, zaś propyzamid i oryzalina powodują rozpad MTk (Furutani *et al.* 2000). Traktowanie roślin formy dzikiej tymi substancjami w niższych koncentracjach prowadzi do zmiany układu MTk w korzeniu z poprzecznego na skośny typu Z, oraz powoduje zwiększenie przyrostu radialnego w korze korzeni i odpowiednie skręcenie organów w lewo (lub zgodnie z ruchem wskazówek zegara). Co więcej, lewoskrętność wprowadzana przez substancje antymikrotubulowe była dominująca w stosunku do prawoskrętności, będącej wynikiem mutacji SPR. Traktowanie mutantów *spr* taksolem lub propyzamidem zmieniło układ MTk ze skośnego typu S do skośnego typu Z, co przekładało się również na zmianę skrętności organów z prawostronnej do lewostronnej. W mutantach *lefty* zastosowanie oryzaliny spowodowało fragmentację i depolimeryzację MTk, co świadczy o ich mniejszej stabilności, oraz generowany był izotropowy wzrost komórek epidermy (Thitamadee *et al.* 2002).

W kontekście powyższych wyników, wysunięto hipotezę, że przyczyną skręcania się tkanek zewnętrznych (które powoduje także skręcenie liści i płatków) jest słabsze wydłużanie się komórek miękiszowych wewnątrz organów pod wpływem

mutacji lub substancji antymikrotubulowych w porównaniu z wydłużaniem się komórek epidermy lub ryzodermy. Aby zmieścić się w skróconym (ze względu na słabsze wydłużanie miękiszu) organie, słupy komórek epidermy układają się helikalnie (Furutani *et al.* 2000, Hashimoto 2002). Słabsze wydłużanie się miękiszu spowodowane jest zmniejszeniem stopnia anizotropii wzrostu; komórki rosną silniej w kierunku poprzecznym.

Należy wyjaśnić dlaczego chiralności skręcenia na poziomie tkanki lub organu oraz skośnego układu MTk są przeciwne. Jeżeli prawdą jest, że kierunek maksymalnego wzrostu jest prostopadły do ułożenia MF, wówczas skośny układ MF typu Z generowałby lewostronny wzrost spiralny, zaś układ typu S, prawostronny wzrost, tak jak koniec rozciąganej sprężyny typu S obraca się zgodnie z kierunkiem ruchu wskazów zegara, powodując, że linia na powierzchni sprężyny, początkowo równoległa do osi sprężyny, staje się helisą typu Z (Lloyd i Chan 2002). Wiadomo już, że skośny układ MTk nie jest konsekwencją spiralnego wzrostu; wynika to z badań, w których obserwowano skośne układy typu Z lub S jeszcze przed pojawieniem się skrętu w epidermie (Thitamadee *et al.* 2002, Buschmann *et al.* 2004).

Prosta zależność pomiędzy chiralnością układu MTk a spiralnym wzrostem nie znajduje potwierdzenia we wszystkich badaniach. W korzeniu mutanta *spr1-6*, który był skręcony w prawo, obserwowano poprzecznie ułożone MTk (Sedbrook *et al.* 2004). Przeniesienie mutanta *mor1* do temperatury powyżej 28^0C, powoduje skrócenie i dezorganizację MTk przy lewostronnym skręceniu korzenia (Whittington *et al.* 2001). Co więcej, takie zaburzenie MTk nie powoduje zmiany w ułożeniu nowotworzonych MF; pozostaje ono poprzeczne w obszarze, gdzie ryzoderma jest skręcona (Sugimoto *et al.* 2003). Należy jednak pamiętać, że aktualnie obserwowane skręcenie na poziomie tkanki nie wynika z aktualnie istniejącego układu MTk ale z układu, który istniał wcześniej.

4.5. WPŁYW NAPRĘŻENIA NA MIKROTUBULE KORTYKALNE

Naprężenie powoduje powstanie odkształceń elastycznych (odwracalnych), a po przekroczeniu pewnego progu, odkształceń plastycznych (nieodwracalnych). Według Gertela i Greena (1977) naprężenie jest rozpoznawane jedynie poprzez odkształcenie, które powoduje; wpływ naprężenia dokonywałby się więc za pośrednictwem odkształcenia jakie powoduje. Nie jest to jednak tak oczywiste jak to może się wydawać botanikom. Na przykład naprężenie zmienia częstość drgań własnych struny,

w materiałach piezoelektrycznych wywołuje różnicę potencjału elektrycznego. Nasuwa się również pytanie o mechanizm percepcji bodźców mechanicznych. Nie wiadomo czy MTk odbierają takie bodźce bezpośrednio (Wymer *et al.* 1996), czy za pośrednictwem MF w ścianie (Williamson 1990,1991) lub receptorów w błonie komórkowej (Zandomeni i Schopfer 1993, 1994).

Williamson (1990,1991) zakłada, że naprężenie (czyli czynnik sam w sobie o charakterze kierunkowym) wpływa bezpośrednio na sensory związane z MF powodując ich odkształcenia (inne niż te związane ze wzrostem); wzór tych odkształceń byłby odwzorowaniem zgodnym ze wzorem rozkładu naprężeń w ścianie. Odkształcenia sensorów byłyby sygnałami przekazywanymi poprzez błonę (białka transbłonowe) do MTk powodując ich odpowiednią orientację. MTk z kolei kierowałyby ułożeniem MF, co determinowałoby kierunek wzrostu. Cały mechanizm działałby więc na zasadzie sprzężenia zwrotnego. Inne czynniki, między innymi regulatory wzrostu, pH, mogłyby wpływać pośrednio na MTk poprzez zmianę właściwości receptorów w błonie lub/i regulację ich ilości; albo bezpośrednio poprzez regulację dynamiki MTk (Kropf *et al.* 1997). Według Williamsona (1990,1991) bezpośredni wpływ wzrostu na układ MTk byłby możliwy tylko w niewielu przypadkach, i wtedy działałby jako element dodatniego sprzężenia zwrotnego podtrzymujący istniejącą oś wzrostu w komórkach cylindrycznych. Procesy związane ze wzrostem mogłyby jednak dostarczać niekierunkowych informacji, na przykład przez zmianę koncentrację jonów, wpływając tym samym na MTk.

Rozróżnienie pomiędzy wpływem naprężenia a odkształcenia (zarówno elastycznego jak i plastycznego) jest na tyle istotne, że maksymalne kierunki naprężenia i odkształcenia mogą być różne w zależności od właściwości anizotropowych ściany komórkowej (Gertel i Green 1977, Richmond 1983). Pięknym przykładem ilustrującym opisane zjawisko, jest komórka *Nitelli*. W komórce cylindrycznej naprężenie w kierunku poprzecznym jest prawie dwa razy większe od tego w kierunku podłużnym. W zależności od ułożenia MF anizotropia naprężeń może generować różne rozkłady odkształcenia. Gdy MTk, a przez co i MF są poprzeczne, wówczas odkształcenie w kierunku podłużnym jest większe niż w kierunku poprzecznym, komórka wydłuża się. W tym przypadku kierunek ułożenia MTk jest równoległy do kierunku maksymalnego naprężenia rozciągającego, jak i prostopadła do kierunku maksymalnego odkształcenia plastycznego. Gdy MF są przypadkowo rozłożone na skutek depolimeryzacji MTk, wówczas odkształcenie poprzeczne jest większe od podłużnego,

komórka rośnie na szerokość. Gdyby i w tym przypadku hipoteza Schopfera miała zastosowanie, nowo tworzące się MF powinny być podłużne; okazało się jednak, że były poprzeczne, czyli równoległe do maksymalnego naprężenia w ścianie.

To, że komórki roślinne i zwierzęce są wrażliwe na naprężenie nie ulega wątpliwości. Istnieją dobre podstawy dla wniosku, że komórki roślinne wyczuwają główne kierunki naprężenia i że według nich orientują kierunek podziału czyli ustawienie nowo tworzonej ściany. W miękiszu rdzeniowym *Nicotiana tabacum* poddanym działaniu sił ściskających orientacja nowoutworzonych ścian była prostopadła do kierunku maksymalnego ściskania (Lintilhac i Vesecky 1984). Lynch i Lintilhac (1997) badali podziały protoplastów znajdujących się w żelu agarozowym. Gdy do żelu lokalnie przyłożono naprężenie, kierunek podziałów protoplastów był zgodny z głównymi kierunkami naprężenia. Z innych badań wiadomo, że protoplasty zaczynają się dzielić dopiero wtedy, gdy zaczynają tworzyć ścianę. Podobny eksperyment wykonano z komórkami z nienaruszoną ścianą. Otrzymano podobne wyniki jak w przypadku protoplastów. Pozwoliło na sformułowanie wniosku, że obecność w pełni wykształconej ściany nie jest warunkiem koniecznym do rozpoznawania głównych kierunków naprężenia. Prawdopodobnie jednak receptory naprężenia znajdują się w warstewce ściany przylegającej do błony komórkowej, podobnie jak w komórkach zwierzęcych, gdzie receptorami są integryny na powierzchni komórki.

Mikrotubule są strukturami mającymi swój udział zarówno w podziale komórki jak i jej wzroście, dlatego prawdopodobne jest, że to właśnie one „wyczuwają" sygnały mechaniczne w postaci naprężenia (lub odkształcenia) i odpowiednio orientują wzrost i podziały komórki. Wpływ naprężenia na MTk na poziomie komórkowym został udokumentowany przez Hush i Overall (1991), które pokazały, że poprzeczne ściskanie korzenia *Pisum sativum* spowodowało reorientację układu MTk z poprzecznego na podłużny. Ściskanie i rozciąganie odpowiednio dolnych i górnych części wyginanych organów również zmienia orientację MTk (Fischer i Schopfer 1998, Ikushima i Shimmen 2005). Układ poprzeczny występuje w częściach rozciąganych, podłużny – w ściskanych. Wpływ naprężania na układ MTk został udokumentowany także w protoplastach *Nicotiana tabacum*. Poprzeczną orientację MTk w stosunku do maksymalnego naprężenia rozciągającego obserwowano w protoplastach zatopionych w żelu agarozowym, do którego przyłożono naprężenie (Fisher i Cyr 2000). Co interesujące, ani krótkotrwałe wirowanie ani naprężanie protoplastów w żelu nie

spowodowało widocznych odkształceń plastycznych, co sugeruje, że albo naprężenie *per se* jest czynnikiem wpływającym na MTk albo też jest nim odkształcenie elastyczne, będące wynikiem naprężania. Dopiero po 72 godzinach po wirowaniu/naprężaniu obserwowano ukierunkowany wzrost protoplastów (w większości przypadków był on prostopadły do ułożenia MTk). Wynika z tego, że MTk reagują na czynniki mechaniczne a uzyskane informacje mogą wykorzystywać do określonej orientacji wzrostu.

Hejnowicz i współpracownicy (2000) wysunęli hipotezę, że MTk układają się w kierunku maksymalnego naprężenia rozciągającego w ścianie komórkowej. Hipoteza ta była oparta na eksperymentach wykorzystujących pasy izolowanej epidermy. Zmiana anizotropii naprężenia po izolacji epidermy z organu a później po przyłożeniu naprężenia rozciągającego miała swoje odzwierciedlenie w orientacji MTk. W epidermie *in situ*, gdzie kierunek maksymalnego naprężenia jest podłużny (z powodu rozciągającego naprężenia tkankowego) układ MTk był stromy (od 20^0 do 40^0). Układ ten zmieniał się na poprzeczny po izolacji epidermy z organu. Izolacja powodowała zanik naprężenia tkankowego, wskutek czego naprężenie w ścianie (powodowane ciśnieniem turgorowym) po izolacji było maksymalne w kierunku poprzecznym. Przyłożenie odpowiednio dużego naprężenia rozciągającego do izolowanych pasów epidermy generowało podłużny układ MTk.

Reguła zakładająca, że układ MTk jest równoległy do kierunku maksymalnego naprężenia rozciągającego w ścianie, znajduje potwierdzenie w innych systemach. W nierosnących komórkach *Nitella* obserwowano poprzeczną orientację MTk, a więc zgodną z maksymalnym naprężeniem w kierunku poprzecznym, wynikającym bezpośrednio z turgoru (Kropf *et al.* 1997). Jednakże wyniki innych badań, w których rozciąganie spowodowało poprzeczny układ MTk (Fischer i Schopfer 1998, Ikushima i Shimmen 2005) wskazują na to, że układ MTk mogą regulować jeszcze inne dodatkowe czynniki.

5. METODY BADAŃ ORIENTACJI MIKROTUBUL

W roku 1983 Ledbetter i Porter jako pierwsi obserwowali „cytoplazmatyczne rurki (tubule)" leżące w warstwie kortykalnej komórek roślinnych, wykorzystując w tym celu mikroskop elektronowy. Mikroskopia elektronowa pomimo swych zalet (duże powiększenie, wysoka rozdzielczość) raczej nie nadaje się do badania globalnego

układu MTk w komórce. Konieczne było opracowanie innej metody pozwalającej na obserwację układu MTk w komórkach.

W przypadku komórek zwierzęcych stosowano znakowanie MT za pomocą przeciwciał anty-tubulinowych (metoda immunocytochemiczna) po uprzednim utrwaleniu badanego materiału. Ta metoda nie mogła być bezpośrednio przełożona na komórki roślinne, z prostej przyczyny: ściana komórkowa jest nieprzepuszczalna dla przeciwciał. Jednakże, krótkotrwałe traktowanie enzymami hydrolizującymi składniki ściany, powoduje częściowe nadtrawienie ściany, w efekcie czego przeciwciała mogą w miarę swobodnie przez nią dyfundować. W ten sposób w roku 1979 Lloyd i współpracownicy uwidocznili układ MT w komórce liścia *Allium cepa* (Lloyd 1999), tym samym dając początek całej serii badań nad MT w różnych fazach cyklu komórkowego. Metoda immunocytochemiczna pozwoliła na obserwację MTk w różnego typu komórkach, tkankach, organach i gatunkach w odpowiedzi na endogenne czynniki rozwojowe i bodźce zewnętrzne; oraz na klasyfikację nachylenia całego układu względem osi komórki na poprzeczny, podłużny i skośny. Wynikiem zastosowania przeciwciał anty-mikrotubulinowych jest obraz MTk w chwili utrwalenia materiału na stosunkowo dużym obszarze, co umożliwia analizę ilościową układów.

Kolejnym krokiem ku zrozumieniu właściwości i funkcjonowania MT w komórce roślinnej było opracowanie metody umożliwiającej ich obserwację *in vivo*. Metoda mikroinjekcji polega na znakowaniu cząsteczek tubuliny rodaminą lub karbofluoresceiną i ich wstrzyknięciu do komórki za pomocą mikropipety bez większego naruszenia struktury obiektu (Hush *et al.* 1994, Yuan *et al.* 1994). Tubulina związana z rodaminą bardzo szybko ulega integracji z MTk, pozwalając na obserwację w czasie reorientacji układu poprzecznego na podłużny (Yuan *et al.* 1994) lub podłużnego na poprzeczny (Lloyd *et al.* 1996). Zastosowanie techniki FRAP (z ang. Fluorescence Redistribution After Photobleaching) umożliwiło oszacowanie kinetyki wymiany dimerów tubuliny w MT (Hush *et al.* 1994). Technika FRAP polega na indukowaniu blaknięcia znacznika fluorescencyjnego związanego z MT w określonym obszarze komórki. Następnie mierzona jest prędkość powrotu do świecenia wyblakłego obszaru, będąca następstwem migracji niewyblakniętych MT. W ten sposób udowodniono, że prędkość wymiany dimerów tubuliny w MTk podczas interfazy jest 3-4 razy szybsza u roślin niż u zwierząt (Hush *et al.* 1994).

W roku 1979 Shimomura wyizolował z meduzy *Aequorea victoria* białko o właściwościach fluoryzujących GFP (z ang. Green Fluorescent Protein). Maksima

absorbcji GFP występują przy długości fali 395nm (UV) [maksimum główne] oraz przy 470nm (światło niebieskie); natomiast maksimum widma emisji jest przy 506nm, co odpowiada długości fali światła zielonego (Chalfie *et al.* 1994). Gen kodujący GFP jako gen reporterowy wprowadzony do komórki i odpowiednio uaktywniony może ulegać ekspresji. Te oraz inne niezwykłe właściwości GFP takie jak: duża stabilność i zdolność do fuzji z innymi białkami przy zachowaniu fluorescencji, spowodowały, że GFP stał się jednym z najbardziej popularnych markerów ekspresji genów, lokalizacji białek w czasie i przestrzeni (Ehrhardt 2003, Dixit *et al.* 2006b). GFP ulegając fuzji z białkiem specyficznym dla określonej struktury (cytoszkielat, błony, mitochondria, jądro) może być jednocześnie jego znacznikiem w żywej komórce, obrazując jej dynamikę w czasie rzeczywistym bez opóźnień (Hanson *et al.* 1995). Obecnie GFP i inne białka będące jego modyfikacjami (YFP z ang. Yellow Fluorescent Protein) lub białka podobne do GFP (DsRed wyizolowane z koralowców) mają swój znaczny udział również w badaniach MT. Dzięki ich zastosowaniu odkryto „hybrid treadmilling" - mechanizm przemieszczania się krótkich odcinków MTk (Shaw *et al.* 2003), określono polarność układu MT (Chan *et al.* 2003, Dixit *et al.* 2006a), zlokalizowano miejsca organizacji MT (Chan *et al.* 2003, Shaw *et al.* 2003, Murata *et al.* 2005) oraz opisano oddziaływania zachodzące pomiędzy pojedynczymi MTk (Dixit i Cyr 2004b). Białka fluorescencyjne znakują MT łącząc się bezpośrednio z cząsteczkami α-tubuliny (Ueda *et al.* 1999, Le *et al.* 2005), β-tubuliny (Nakamura *et al.* 2004, cytowane za Wasteneys i Yang 2004) lub pośrednio poprzez domenę wiążącą MBD (z ang. Microtubule Binding Protein) [Marc *et al.* 1998, Granger i Cyr 2001], białko MAP: AtEB1 (Chan *et al.* 2003, Dixit i Cyr 2006a). Pomimo niepodważalnych zalet badań *in vivo* z wykorzystaniem GFP i jego pochodnych należy mieć na uwadze różne czynniki, mogące wprowadzać artefakty przy tego typu badaniach (Wasteneys i Yang 2004, Dixit *et al.* 2006). Już samo przygotowanie żywego obiektu, wiążące się z jego umieszczeniem w mikroskopie oraz naświetlaniem podczas obserwacji może wywołać niepożądaną reakcję na zranienie, dotyk, światło i grawitację. Ostatnio pojawiły się również doniesienia o negatywnym wpływie GFP na białko, z którym jest związane. Dotyczyły one zmiany konformacji białka oraz jego lokalizacji w komórce. MTk znakowane GFP-MBD w niektórych komórkach tworzą grubsze wiązki niż normalnie i są odporne na działanie substancji anty-mikrotubulowych (Marc *et al.* 1998, Granger i Cyr 2001). Prawdopodobnie zmiany te są wynikiem wysokiej ekspresji GFP-MBD w komórkach. W fenotypie transgenicznych *Arabidopsis* wykazujących ekspresję GFP

można również obserwować pewne zaburzenia: skrócenie korzeni, skręcenie organów w prawo (Ueda *et al.* 1999, Granger i Cyr 2001, Hashimoto 2002).

Należy również dodać, że sama wizualizacja MT za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej wprowadza artefakty. Zbyt mała rozdzielczość mikroskopu uniemożliwia obserwowanie pojedynczych MT a znakowanie fluorochromami wyolbrzymia ich rzeczywiste rozmiary. MTk widoczne we fluorescencji wydają się być długie, lecz tak naprawdę są to wiązki składające się z kilku krótszych odcinków MTk (Williamson 1991). Badania wykorzystujące mikroskopię elektronową pokazują, że w takiej wiązce krótkie MTk często krzyżują się ze sobą. Dlatego jeśli obserwuje się we fluorescencji układ MTk tworzący z osią pewien kąt, to należy pamiętać, że jest to jedynie średni kąt nachylenia MTk, w rzeczywistości zakres kątów jest znacznie szerszy.

6. ZADANIA I CEL PRACY

Ogólnie uważa się, że MTk determinują (choć nie jako jedyny czynnik) kierunek maksymalnego wzrostu komórki poprzez wyznaczanie kierunku odkładania nowo tworzonych MF. Czynniki zewnętrzne, takie jak egzogenna auksyna, światło, naprężenie mechaniczne oraz czynniki wewnętrzne (rozwojowe) wpływają na MTk modyfikując ich układ względem osi komórki. Odwrotną zależność postuluje hipoteza zaproponowana przez Schopfera i jego współpracowników, według której układ MTk zależy od kierunku maksymalnego wzrostu. Komórki rosnące na długość (wydłużające się) charakteryzują się poprzecznym układem MTk w stosunku do osi komórki, zaś w komórkach, które nie ulegają wydłużaniu, układ MTk jest podłużny. Zgodnie z tą hipotezą działanie regulatorów wzrostu, światła czy naprężenia na układ MTk nie jest wpływem *per se*, a ma jedynie charakter pośredni, sprowadza się bowiem do wpływu tych czynników na względne szybkości wzrostu w różnych kierunkach. Głównym celem pracy jest sprawdzenie tej hipotezy na przykładzie izolowanej epidermy hipokotyla słonecznika, której szybkość wydłużania można regulować przyłożonym naprężeniem podłużnym i za pomocą pH roztworu, w którym inkubowana jest epiderma.

Koncentracja protonów, która pełni tak istotną rolę w procesach wzrostowych jest czynnikiem nie ujętym do tej pory w badaniach nad MTk. Drugim czynnikiem

warunkującym wzrost jest stan naprężenia ściany komórkowej, również niedostatecznie uwzględniany w badaniach układu MTk.

Hipokotyle słonecznika są bardzo dogodnym obiektem do tego typu badań, bowiem łatwo jest wyizolować żywe pasy epidermy z organu. Zaletą izolowanych pasów jest dostępność buforu do komórek epidermy od strony ściany wewnętrznej. Obecność kutikuli na ścianie zewnętrznej utrudnia wnikanie protonów przy podaniu buforów na powierzchnię hipokotyla. Należy jednak podkreślić, że w izolowanych pasach tkanek zewnętrznych występuje zależność wydłużania od pH tylko pod warunkiem, że będą one odpowiednio naprężane. Aby izolowany pas epidermy wydłużał się trzeba przyłożyć naprężenie rozciągające, kompensujące naprężenie tkankowe, które zostało usunięte przez izolację. W przypadku izolowanych pasów epidermy istnieją więc czynniki ograniczające wydłużanie: pH apoplastu i naprężenie. Oba czynniki mogą być regulowane eksperymentalnie. Analiza układu MTk w warunkach zmiennego pH i naprężenia daje możliwość ewentualnej falsyfikacji hipotezy Schopfera. Jeżeli hipoteza ta jest słuszna, to zwiększenie szybkości wydłużania epidermy, będące wynikiem działania obniżonego pH i przyłożonego podłużnego naprężenia rozciągającego do pasa izolowanej tkanki, powinno znaleźć swoje odzwierciedlenie w poprzecznym układzie MTk.

Koncentrację protonów w apoplaście można modulować stosując jako roztwór inkubujący różnego rodzaju bufory. Substancją mającą wpływ na wzrost organów a działającą za pośrednictwem pH jest również fuzykokcyna (FC). Stymuluje ona wypływ protonów z komórki do apoplastu poprzez aktywację pomp H^+-ATP. Dotychczas nie jest poznany wpływ FC na układ MTk, więc szczególnie interesujące jest podjęcie tego problemu.

Zmiany w układzie MTk wiązano zazwyczaj z wpływem czynników zewnętrznych bądź wewnętrznych (rozwojowych). Układ MTk wykazuje zdolność do autonomicznej reorientacji mającej charakter rotacji. Działanie czynników na układ MTk mogłoby więc polegać na modulacji autonomicznej reorientacji MTk, co w efekcie prowadziłoby do zmiany orientacji ich układu. Dyskusja otrzymanych wyników w kontekście autonomicznej reorientacji może rzucić nowe światło na mechanizm działania MTk.

II. MATERIAŁY I METODY

1. MATERIAŁ

Do badań użyto proste hipokotyle *Helianthus annus* o długości 6-7cm (**Ryc.9**) wyhodowane z nasion odmiany Wielkopolski (Hodowla Roślin, Strzelce, Sp.z.o.o, Oddział w Borowie) w ciemności w pojemnikach plastikowych z ziemią ogrodniczą w temperaturze 22±2^{0}C. Wszystkie eksperymenty wykonano przy zielonym świetle.

Ze strefy hipokotyla, uprzednio zaznaczonej markerem (pisak wodoodporny, OHP-marker, Edding, International GmbH, Germany, nie uszkadzający komórek), a znajdującej się w odległości od 5 do 35mm poniżej węzła liścieniowego, pobierano (izolowano) pas epidermy o szerokości 1-2mm poprzez oddzielenie go z organu za pomocą pincetki. Pincetkę wbijano możliwie stycznie do powierzchni i prostopadle do długiej osi hipokotyla, następnie przesuwano pincetkę akropetalnie, oddzielając tym samym pas epidermy od reszty tkanek. Wyizolowane pasy, oprócz warstwy epidermy, zawierały dodatkowo subepidermę i 1-2 warstwy miękiszu. Pasy epidermy pobierano z naddatkiem 2-3mm na końcach, do których w kolejnych etapach postępowania doklejano centymetrowe paski plastykowe (wycięte z komercyjnych pojemników dla produktów mlecznych) dalej zwane wzmocnieniami plastikowymi. Stosowano klej cyjanoakrylowy (Permabond, Sigma-Aldrich) zestalający się natychmiast po zetknięciu z wodą. Do analizy szybkości wzrostu i orientacji MTk, pas epidermy dzielono na trzy strefy: strefę I (której odpowiednik w hipokotylu znajdował się pomiędzy 5 a 15mm od węzła liścieniowego), strefę II (15-25mm) oraz strefę III (25-35mm).



Ryc.9. Typowe hipokotyle słonecznika z wyróżnionymi strefami**.**

2. POMIAR SZYBKOŚCI WZROSTU HIPOKOTYI *IN SITU*

Na hipokotylach rosnących w pojemnikach plastikowych, zaznaczono markerem granice trzech stref, każdą o długości 10mm (l_0): strefę I (5-15mm od węzła liścieniowego), strefę II (15-25mm) i strefę III (25-35mm) [**Ryc.9**]. Po 20h (Δt) hipokotyle ucięto i papierem milimetrowym zmierzono długość kolejnych stref (l_k). Średnią szybkość wzrostu hipokotyla w ciągu tych 20h obliczono ze wzoru:

$$V = \frac{l_k - l_0}{l_0 \Delta t} 100\%$$

Pomiaru dokonano dla 22 hipokotyli. Do analizy statystycznej zastosowano test t-Studenta (p=0.05).

W zasadzie możliwy był pomiar za pomocą ekstensiometru podobny do tego, jaki zastosowano do izolowanych pasów epidermy. Taki pomiar byłby dokładniejszy, bo Δt mogłaby być znacznie mniejsze. Chodziło jednak tylko o bardzo ogólną charakterystykę wzrostową hipokotyla.

3. POMIAR DŁUGOŚCI I SZEROKOŚCI KOMÓREK EPIDERMY

Z hipokotyla wyizolowano pas epidermy zawierający strefy I, II oraz III, następnie w mikroskopie świetlnym (Olympus, BX41) wykonano 3 zdjęcia aparatem cyfrowym (Olympus, Camedia 3040 ZOOM) komórek epidermy z każdej strefie (dwa zdjęcia przy początku i końcu strefy, jedno pośrodku). Przy pomocy programu AnalySIS (AnalySIS Image Processing, Soft Imaging System, GmbH) dokonano pomiaru długości i szerokości zewnętrznych ścian peryklinalych komórek epidermy. W ten sposób przebadano 4 hipokotyle a otrzymane wartości uśredniono. W sumie, liczba pomiarów długości w poszczególnych strefach wynosiła: $n_{\text{strefa I}}=1513$, $n_{\text{strefa II}}=704$, $n_{\text{strefa III}}=335$; liczba pomiarów szerokości: $n_{\text{strefa I}}=1740$, $n_{\text{strefa II}}=1100$, $n_{\text{strefa III}}=663$.
Do analizy statystycznej zastosowano test t-Studenta (p=0.05).

4. BADANIE ORIENTACJI MIKROTUBUL KORTYKALNYCH W EPIDERMIE IN SITU

Zbadano 14 hipokotyli. Z każdego hipokotyla pobierano jeden pas zawierający trzy strefy poprzednio zdefiniowane i natychmiast utrwalano.

Aby sprawdzić czy istnieje zmienność orientacji MTk w kierunku obwodowym hipokotyla, przeprowadzono dodatkowe badania, w których pobierano dwa pasy

epidermy (znajdujące się w odległości około 2mm od siebie) z jednego hipokotyla i natychmiast utrwalano. W sumie pobrano 14 pasów epidermy z 7 hipokotyli.

5. BADANIE KINETYKI ZMIAN ORIENTACJI MIKROTUBUL KORTYKALNYCH PO WYIZOLOWANIU EPIDERMY Z HIPOKOTYLA

Do końców wyizolowanych pasów epidermy doklejano klejem cyjanoakrylowym wzmocnienia plastikowe (ułatwiające manewrowanie izolowaną tkanką). Pasy przenoszono do szalek z bibułą filtracyjną nasycone niebuforowaną pożywką Murashige&Shoog (MS) z zawartością sacharozy 2%. Czynności te od momentu wyizolowania nie trwały dłużej niż 5min.

Pasy epidermy (ułożone kutikulą do góry) były inkubowane przez 0.5, 1, 2, 4, 6 oraz 12, 14, 16, 18h od momentu wyizolowania z organu, następnie utrwalane i badano w nich układ MTk. Zbadano 14 hipokotyli dla epidermy inkubowanej przez 0.5h oraz po 10 hipokotyli dla pozostałych czasów inkubacji.

6. BADANIE WPŁYWU SPOSOBU ODDZIELANIA PASA EPIDERMY Z HIPOKOTYLA

W celu sprawdzenia jaki efekt może mieć sposób oddzielania epidermy z hipokotyla, oprócz standardowej metody wykorzystującej pincetkę, zastosowano również wycinanie epidermy wraz z kilkoma warstwami miękiszu za pomocą żyletki. Cięcie było możliwie płytkie i styczne do powierzchni hipokotyla. Pasy epidermy pobierane tymi dwoma sposobami były natychmiast po pobraniu z organu utrwalane. Przebadano po 2 pasy dla każdego wariantu.

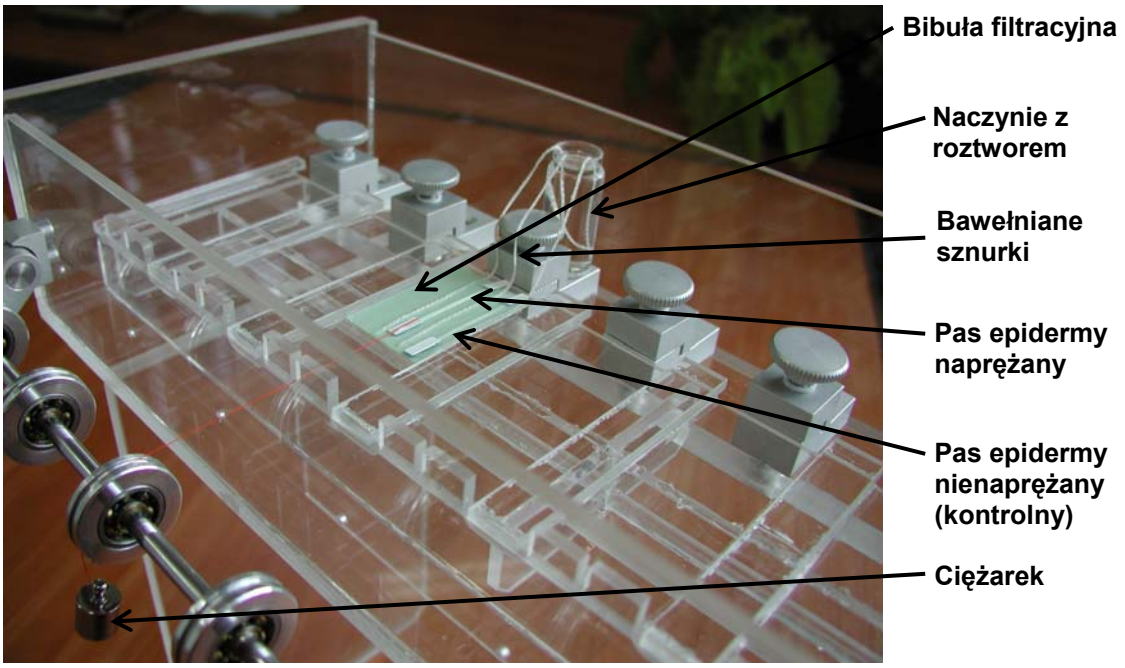
7. BADANIE WPŁYWU pH I NAPRĘŻENIA NA ORIENTACJĘ MIKROTUBUL KORTYKALNYCH W IZOLOWANYCH PASACH EPIDERMY

Wpływ pH i naprężenia był badany w izolowanych pasach epidermy inkubowanych w kontakcie z odpowiednim roztworem przez około 12-14h od momentu pobrania z hipokotyla i naprężanych w ciągu ostatniej godziny.

Po pobraniu dwóch pasów epidermy (o szerokości około 1mm i długości ponad 30mm) z jednego hipokotyla (strefa 5-35mm), do ich końców doklejano wzmocnienia plastikowe. Następnie pasy przenoszono na fragment bibuły filtracyjnej nasyconej buforowaną (bufor MES albo bufor fosforanowy, 20mM) pożywką MS z zawartością

sacharozy 2% o pH 4.5 lub 6.5 na stanowisku w przyrządzie, w którym jeden z pasów był naprężany (**Ryc.10**). Wzmocnienie na jednym końcu tego pasa było unieruchomione w uchwycie przyrządu, wzmocnienie na drugim końcu pozostawało swobodne, ale było połączone klejem cyjanoakrylowym z nitką bawełnianą przewieszoną przez mogący obracać się bloczek. Koniec nitki, zwieszający się na zewnątrz komory przyrządu miał pętelkę, do której można było doczepić odpowiedni ciężarek. Drugi pas z wolnymi wzmocnieniami znajdował się obok. W przyrządzie było 8 stanowisk wewnątrz wspólnej komory. Jej ściany były wyścielone bibułą nasyconą wodą destylowaną aby zapewnić 100% wilgotności wewnątrz komory. Pasy (ułożone kutikulą do góry) były inkubowane przez noc (około 12-14h). Aby zapewnić dostatek pożywki do bibuły na każdym stanowisku dołączono dwa cienkie sznurki bawełniane z końcami zanurzonymi w naczyńku z odpowiednią buforowaną pożywką. W czasie trwania eksperymentu z naczyńka poprzez jedno stanowisko wypływało około 5-10ml pożywki. Aby przyłożyć naprężenie do pasa, na nitkę doczepiano odpowiedni ciężarek. Na pas działała wtedy siła rozciągająca równa sile ciężkości ciężarka, a pas mógł swobodnie zmieniać długość pozostając w warstewce pożywki. Siła działająca na pas (o szerokości około 1 mm) wynosiła 0.05N lub 0.08N. Po godzinie od przyłożenia siły pasy utrwalano.

Pomiaru ciśnienia osmotycznego dokonano za pomocą osmometru (Marcel os 3000).



Ryc.10. Przyrząd, w którym izolowane pasy epidermy były inkubowane przez 12-14h a następnie naprężane. Dla wyrazistości, tylko jedno „stanowisko" jest obsadzone (bibuła z pasami epidermy).

8. IMMUNOCYTOCHEMICZNE ZNAKOWANIE MIKROTUBUL KORTYKALNYCH

Pasy epidermy utrwalano przez 1h w roztworze 3.7% paraformaldehydu w buforze stabilizującym MT (MTSB: 100mM PIPES, 1mM $MgCl_2$ x $6H_2O$, 5mM EGTA, pH=6.8) z dodatkiem 1% DMSO oraz 0.05% Tritonu. Pasy płukano w MTSB przez co najmniej 10min a następnie przenoszono na szkiełko podstawowe z naklejoną taśmą samoprzyczepną. Pod lupą (Olympus, SZH 10) pasy epidermy (ułożone kutikulą do góry) nacinano przy pomocy żyletki (krótkie cięcia w poprzek pasa), aby umożliwić dostęp przeciwciał do wnętrza komórek; w efekcie, MTk były wyznakowane tylko w naciętych komórkach (**Ryc.11a**). Taśma samoprzylepna na szkiełku umożliwiała wgłębienie się ostrza żyletki poniżej komórek, co ułatwiało precyzyjne nacięcie tkanki. Nacinanie utrwalonego uprzednio materiału nie powodowało zaburzeń układu MTk w komórkach (**Ryc.11b**). Po nacięciu pasy epidermy były przenoszone na czyste szkiełko podstawne, do którego końce pasów były mocowane klejem cyjanoakrylowym, aby zapobiec ich przemieszczaniu podczas kolejnych zabiegów. Tak przymocowane pasy dwukrotnie płukano w MTSB (minimum 15min), inkubowano przez 10min w 1% Tritonie (sporządzonym na MTSB) i znów płukano w MTSB. Następnie pasy były inkubowane w wilgotnej komorze przez 1h w temperaturze 37^0C w roztworze pierwszego przeciwciała (monoklonalna anty-α-tubulina, Sigma-Aldrich) rozcieńczonym w stosunku 1:200 w buforze PBS (0.14M NaCl, $3x10^{-3}$M KCl, $8x10^{-3}$M Na_2HPO_4, $15x10^{-3}$M KH_2PO_4) z dodatkiem BSA (1mg/ml, Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich). Po 10-minutowym płukaniu w PBS, pasy inkubowano przez 1h w drugim przeciwciele rozcieńczonym w stosunku 1:100 w buforze PBS z dodatkiem BSA (1mg/ml). Pasy były płukane w PBS przez minimum 30min, końce pasów przyklejone do szkiełka odcinano i preparaty zamykano w 50% roztworze glicerolu z p-fenylonodiaminą w PBS (czynnik zapobiegający blaknięciu).

9. ANALIZA ILOŚCIOWA ORIENTACJI MIKROTUBUL KORTYKALNYCH

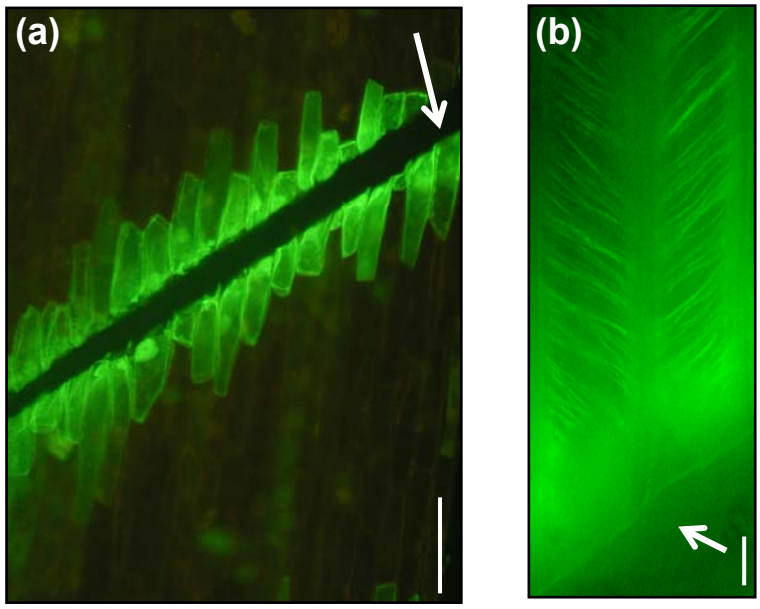
Przed przystąpieniem do obserwacji mikroskopowej MTk, pasy epidermy podzielono na trzy strefy: strefę I (odpowiadającej strefie znajdującej się o odległości 5-15mm od węzła liścieniowego w hipokotylu), strefę II (15-25mm) oraz strefę III (25-35mm). Wiązki MTk obserwowano pod mikroskopem fluorescencyjnym (Olympus, BX41) i w każdej ze stref wykonywano zdjęcia aparatem cyfrowym (Olympus, Camedia 3040 ZOOM) w tych fragmentach komórek (o długości nie mniejszej niż szerokość

komórki), w których widoczne były równolegle ułożone MTk pod zewnętrzną ścianą epidermy. Fragmenty z równoległym układem MTk stanowiły około 90% wszystkich fragmentów z widocznymi MTk.

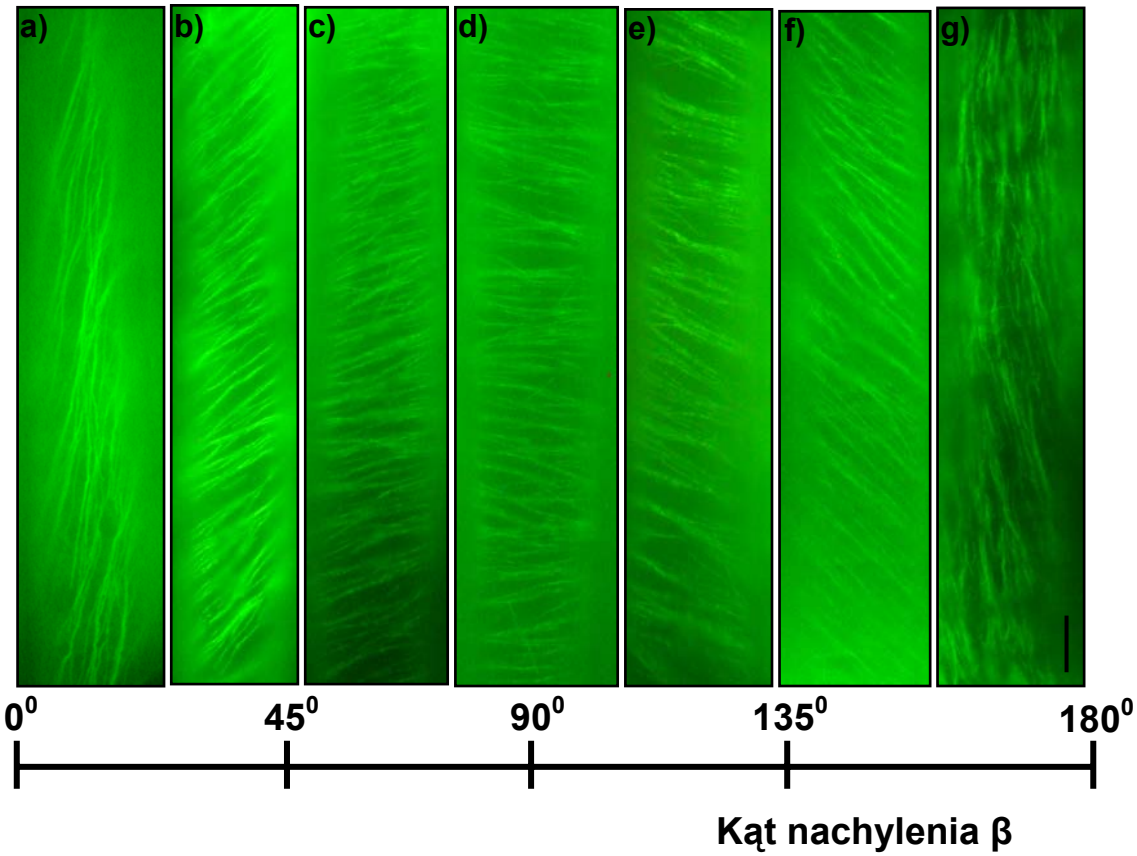
Kąty nachylenia (β) wiązek MTk względem długiej osi komórki były mierzone na podstawie otrzymanych zdjęć. Do pomiaru kątów wykorzystano program AnalySIS (AnalySIS Image Processing, Soft Imaging System, GmbH). Kąt nachylenia (β) wiązek MTk był mierzony dwukrotnie dla pojedynczego fragmentu komórki Z powodu różnej efektywności wizualizacji MTk metodą immunocytochemiczną dokonywano różnej liczby pomiarów w każdej strefie, w większości przypadków nie mniej niż 30. Jednakże, w wyjątkowych przypadkach (na **Ryc.25 Ic, Ryc.26 Ih, IIIj, Ryc.27 IIi, Ryc.33 Ie,f, IIe, Ryc.34 Ii**) liczba pomiarów w histogramach zawarta była między 28 a 16. Histogramy te uwzględniono w badaniach z powodu satysfakcjonującej liczby pomiarów w innych strefach tego samego pasa.

Częstość występowania kątów nachylenia (β) względem długiej osi komórki w populacji komórek przedstawiono w postaci histogramów w zakresie 0^0-180^0 z interwałem co 10^0. Wykresy mają postać słupków lub linii będącej obwiednią słupków (ten drugi rodzaj wykresu zastosowano głównie dla histogramów zbiorczych, będących uśrednieniem poszczególnych histogramów z danego wariantu badawczego).

Orientację MTk określano jako podłużną, gdy MTk były nachylone pod kątem (β) 0^0-10^0 (**Ryc.12a**) lub 170^0-180^0 (**Ryc.12g**) w stosunku do długiej osi komórki; jako poprzeczną, gdy kąt nachylenia β wynosił $90^0 \pm 10^0$ (**Ryc.12d**). Przy nachyleniu 10^0-80^0 i 100^0-170^0 orientację MTk określano jako skośną, przy czym wyróżniono orientację skośną „na prawo" w zakresie $\beta = 10^0$-80^0 (układ skośny Z, **Ryc.12b,c**) i „na lewo" w zakresie $\beta = 100^0$-170^0 (układ skośny S, **Rys.12e,f**). Aby dodatkowo rozróżnić orientacje skośne o większym i mniejszym stopniu nachylenia, wprowadzono określenie orientacji mniej i bardziej stromej. Orientacja bardziej stroma to taka orientacja skośna, która jest bliższa orientacji podłużnej (**Ryc.12b,f**), zaś mniej stroma – bliższa orientacji poprzecznej (**Ryc.12c,e**).



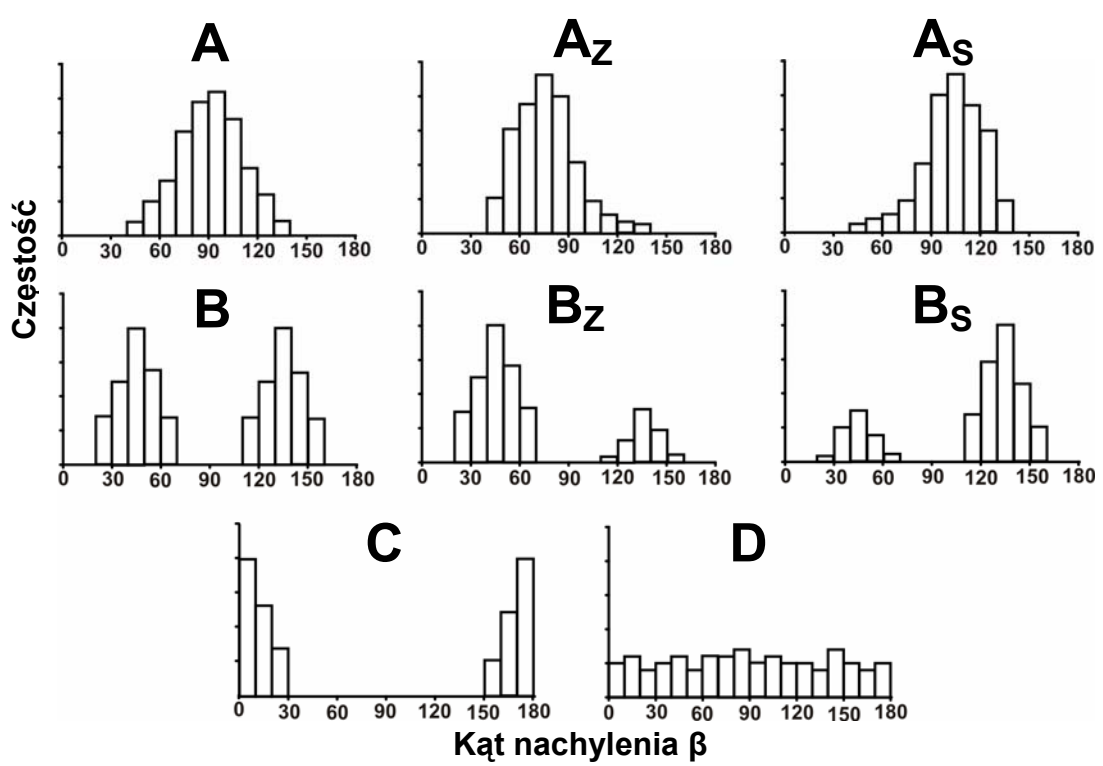
Ryc.11. Epiderma hipokotyla słonecznika z wyznakowanymi MTk w naciętych komórkach. Nacięcie oznaczono strzałką. (**a**) Tubulina świecąca na zielono została wyznakowana tylko w tych komórkach, które zostały przecięte po utrwaleniu. Skala 100µm. (**b**) Układ MTk w komórkach epidermy nacinanych po utrwaleniu materiału. Widoczne na zdjęciu nacięcie nie zaburza układu MTk. Skala: 10µm.



Ryc.12. Orientacja MTk pod zewnętrzną ścianą w różnych komórkach epidermy hipokotyla słonecznika. Wiązki MTk są mniej więcej równoległe względem siebie i nachylone pod określonym kątem w stosunku do długiej osi komórki. Gdy $\beta = 0^0\text{-}10^0$ (**a**) lub $\beta = 170^0\text{-}180^0$ (**g**) orientacja MTk jest podłużna; gdy $\beta = 10^0\text{-}80^0$ (**b,c**) orientacja jest skośna „na prawo" (Z); gdy $\beta = 90^0 \pm 10^0$ (**d**) orientacja MTk jest poprzeczna; gdy $\beta = 100^0\text{-}170^0$ orientacja jest skośna „na lewo" (S). Skala: 10µm.

Histogramy podzielono na typy w zależności od położenia maksimum i minimum za Hejnowiczem (2005), (**Ryc.13**). Typ A histogramu posiada maksimum przy orientacji poprzecznej, minimum zaś przy orientacji podłużnej. W typie B histogramu występują dwa maksima przy orientacji skośnej Z i S, minima przy orientacjach podłużnej i poprzecznej. W typie C histogramu maksimum występuje przy orientacji podłużnej, minimum przy orientacji poprzecznej. Typ D histogramu nie posiada maksimum ani minimum, wszystkie klasy są mniej więcej równo obsadzone. Dodatkowo mogą występować histogramy, będącymi złożeniami głównych typów, a mianowicie typ AB oraz BC.

Histogramy mogą być symetryczne, gdy częstość występowania orientacji skośnych Z i S jest mniej więcej równa. Gdy jedna z form Z lub S przeważa histogram jest asymetryczny. Typy histogramów A_Z i A_S posiadają maksimum przesunięte w niewielkim stopniu w stronę orientacji skośnych, odpowiednio, Z i S. Typy B_Z i B_S posiadają maksimum główne przesunięte znacznie w stronę orientacji skośnych, odpowiednio, Z i S, oraz maksimum lokalne, symetryczne względem maksimum generalnego.



Ryc.13. Różne typy histogramów przedstawiające (teoretyczne) rozkłady częstości występowania kątów nachylenia MTk w populacji komórek.

Do analizy statystycznej histogramów wykorzystano test Kołmogorowa-Smirnowa (p=0.01). Test Kołmogorowa-Smirnowa należy do testów nieparametrycznych i jest stosowany do porównywania rozkładów zmiennych losowych w próbach, niezależnie od postaci tych rozkładów (Gondko *et al.* 2001). Weryfikacja hipotezy zerowej (że dwie próby o licznościach n_1 i n_2 mają jednakowy rozkład) opiera się na badaniu maksymalnej bezwzględnej różnicy prawdopodobieństw pomiędzy dwoma empirycznymi rozkładami skumulowanymi.

10. POMIAR SZYBKOŚCI WZROSTU IZOLOWANCH PASÓW EPIDERMY W ZALEŻNOŚCI OD pH I NAPRĘŻENIA

Po pobraniu pasa (o szerokości około 1mm i długości ponad 30mm) ze strefy hipokotyla znajdującej się pomiędzy 5-35mm od węzła liścieniowego, do jego końców doklejano wzmocnienia plastikowe oraz znaczniki w formie wąskich odcinków samoprzylepnej taśmy, dzielące pas na strefy: I, II i III zdefiniowane poprzednio. Pas umieszczano na bibule stanowiska w przyrządzie opisanym w rozdziale 7 albo na stanowisku maszyny wytrzymałościowej (patrz niżej). Kolejne etapy postępowania do momentu naprężania (tj. warunki inkubacji pasa) były takie same jak w przypadku badania wpływu pH i naprężania na orientację MTk (Rozdział 7).

Pomiarów wzrostu (odkształcenia) poszczególnych stref dokonywał automatycznie ekstensometr (kamera cyfrowa, MESSPHYSIK, 1362 CA) umieszczony nad stanowiskiem. Wyznaczał on odkształcenie względne poszczególnych stref co 2s, zapisując dane w pamięci komputera. Szybkość wzrostu była wyznaczana w czasie 0.2-1h od momentu przyłożenia siły. Pas był naprężany (poprzez dołączenie odpowiedniego ciężarka w przyrządzie) siłą 0.05N oraz 0.08N przez 1h. Naprężanie pasa siłą 0.01N odbywało się w maszynie wytrzymałościowej (MTS SYNERGIE 100, MN), przy czym odkształcenie było mierzone również ekstensometrem. Aby umożliwić działanie ekstensometru pomiary były dokonywane przy zielonym świetle.

11. BADANIE WPŁYWU FUZIKOKCYNY NA SZYBKOŚĆ WZROSTU IZOLOWANYCH PASÓW EPIDERMY ORAZ NA ORIENTACJĘ MIKROTUBUL KORTYKALNYCH

Pomiaru szybkości wzrostu wydłużeniowego dokonano dla izolowanych pasów epidermy preinkubowanych przez 12-14h (*i*) oraz ze skróconym czasem preinkubacji - przez 1h (*ii*). W pierwszym przypadku (*i*) postępowano tak samo jak przy badaniu

wpływu pH na szybkość wzrostu (patrz rozdział 10), z tym wyjątkiem, że do inkubacji użyto najpierw niebuforowanej pożywki MS (preinkubacja), zaś podczas naprężania (1h) pasy były inkubowane w niebuforowanej pożywce MS z FC (koncentracja 10^{-5} i 10^{-6}M) lub w pożywce MS bez FC (kontrola). Postępowanie w przypadku drugim (*ii*) było następujące: po zamocowaniu wzmocnień plastikowych i znaczników samoprzylepnych pasy przenoszono do szalki z roztworem niebuforowanej pożywki MS, gdzie pasy były preinkubowane przez 1h (swobodnie „pływając" w roztworze), w celu usunięcia substancji uwolnionych w czasie izolowania pasa. Po preinkubacji pasy przenoszono do przyrządu, a kolejne etapy postępowania były takie jak poprzednio.

W związku z ograniczoną ilością FC pomiary szybkości wzrostu i znakowanie MTk były dokonywane na tych samych pasach, tj. po zakończonym pomiarze pasy natychmiast utrwalano i wykorzystując techniki immunnocytochemiczne znakowano MTk. Dla pasów inkubowanych w niebuforowanej pożywce MS bez dodatku FC osobno dokonano pomiarów szybkości wzrostu, a osobno znakowania MTk.

12. BADANIE WPŁYWU ŚWIATŁA BIAŁEGO NA ORIENTACJĘ MIKROTUBUL KORTYKALNYCH W PASACH EPIDERMY INKUBOWANYCH PRZEZ 12-14 GODZIN

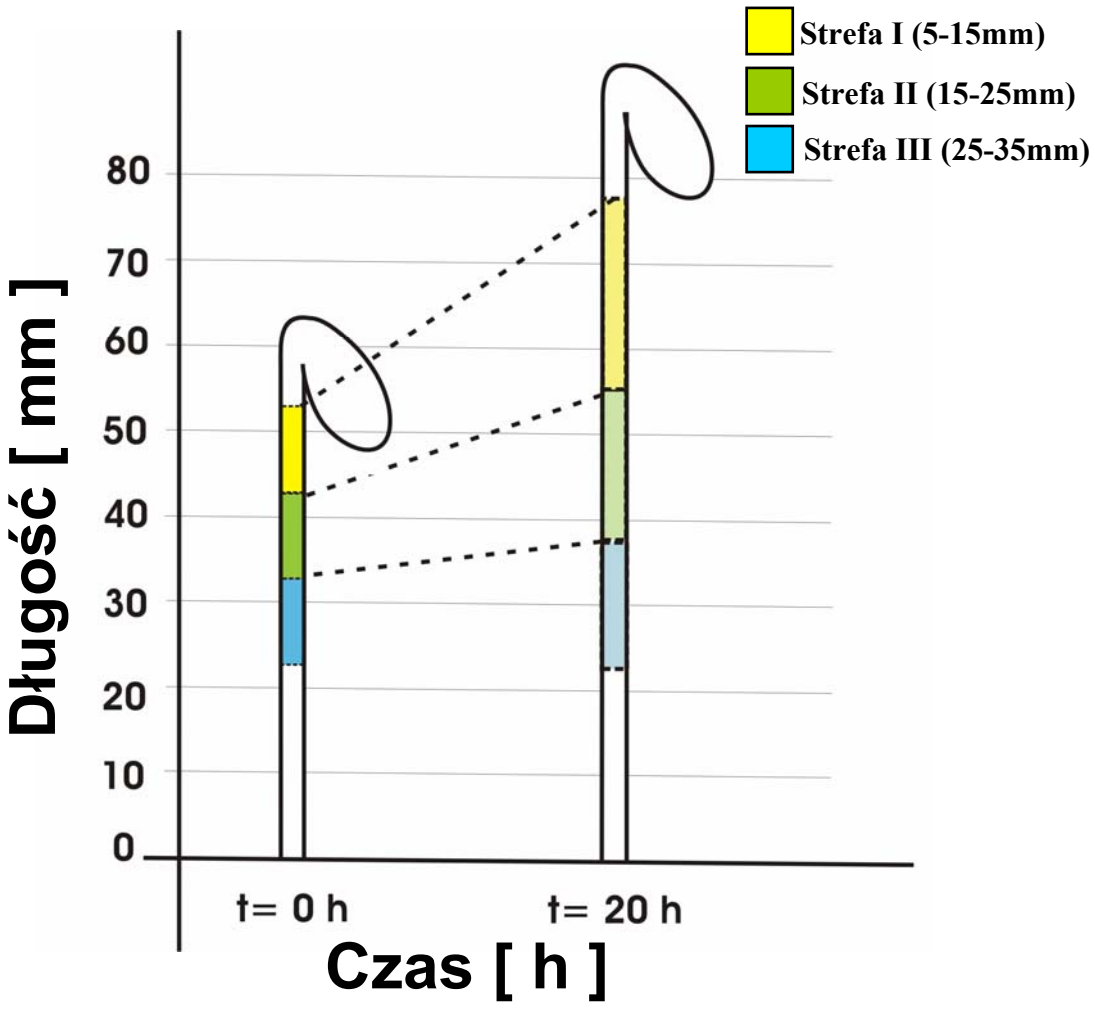
Postępowanie było podobne do tego, w przypadku badania wpływu pH i naprężania na orientację MTk w pasach inkubowanych przez 12-14h w buforowanej pożywce MS o pH 4.5 (bufor MES, 20mM), (Materiały i Metody, rozdział 7) z wyjątkiem ostatniego etapu. Po inkubacji jeden z pary pasów był wstępnie naprężany przez 15 minut siłą 0.05N, po czym przez kolejną godzinę oba pasy naświetlano światłem białym pochodzącym z oświetlaczy halogenowych (Olympus, natężenie światła 18W m^{-2} lub Optel, HOP, natężenie światła 24W m^{-2}) kierując wiązkę światła głównie na strefę I i II. Pasy następnie utrwalano. Przebadano po 3 pasy epidermy dla każdego wariantu (pasy naprężane i nienaprężane) dla światła białego. W histogramie zbiorczym (**Ryc.30**) dla porównania przedstawiono histogram dla pasów nienaświetlanych z **Ryc.28a,a'** dla pH 4.5.

III. Wyniki

1. CHARAKTERYSTYKA BADANYCH STREF EPIDERMY HIPOKOTYLA

1.1. Szybkość wzrostu wydłużeniowego i rozmiary komórek

W hipokotylu słonecznika szybkość wzrostu wydłużeniowego zależy od położenia względem węzła liścieniowego (**Ryc.14**): największa jest w strefie I leżącej od 5 do 15mm poniżej węzła liścieniowego - wynosi 6.07 % h^{-1} i ulega zmniejszeniu w kierunku bazalnym hipokotyla do 2.48 % h^{-1} w strefie III (25-35mm), (**Tab.1**).



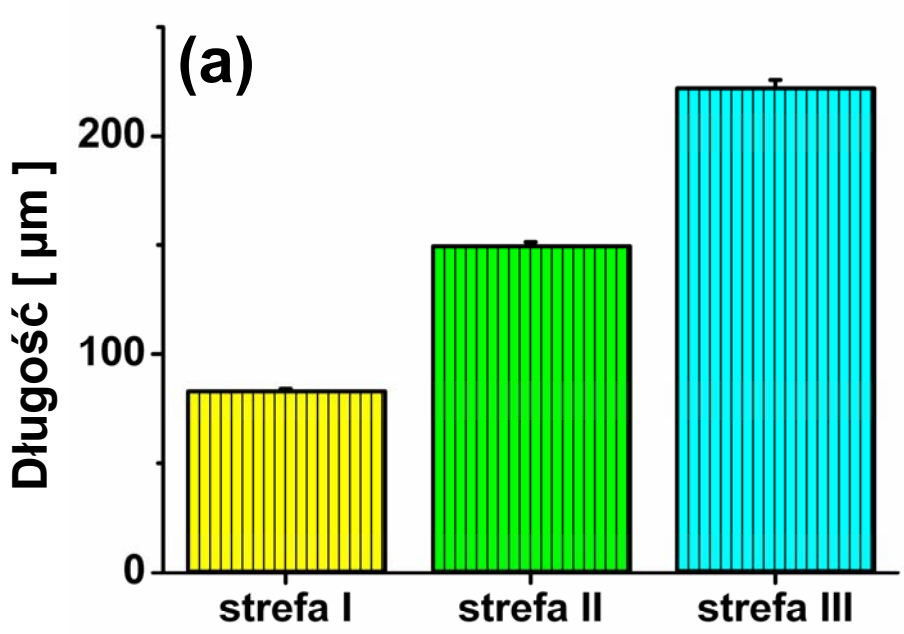
Ryc.14. Schematyczna ilustracja przyrostów na długość w różnych strefach hipokotyla rosnącego w ciemności.

Tab.1. Średnia szybkość wzrostu wydłużeniowego w różnych strefach hipokotyla rosnącego w ciemności (±SE). Wszystkie wartości różniły się statystycznie (test t-Studenta, p=0.05).

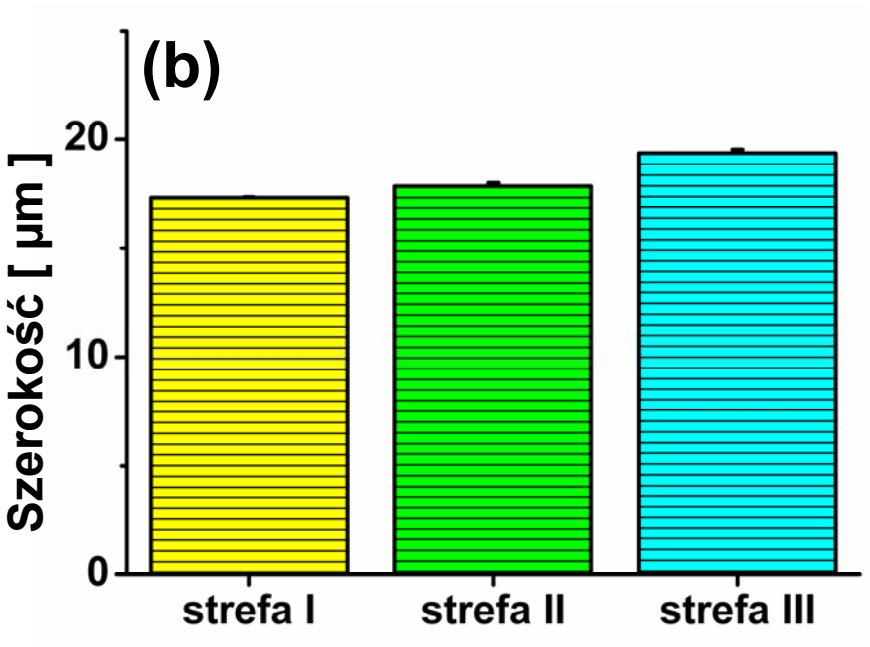
Strefa hipokotyla	**Szybkość wzrostu wydłużeniowego [% h^{-1}] wartość średnia ± SE**	**n**
Strefa I (5-15mm)	**6.07 ± 0.21**	**22**
Strefa II (15-25mm)	**3.89 ± 0.13**	**22**
Strefa III (25-35mm)	**2.48 ± 0.13**	**22**

W badanych strefach nie występują podziały w epidermie; nie stwierdzono występowania pierścienia przedeprofazowego, wrzeciona mitotycznego ani fragmoplastu w żadnej z badanych stref.

W poszczególnych strefach rozmiary komórek epidermy różnią się (**Ryc.15a**). W strefie I (5-15mm) komórki są najkrótsze W stosunku do strefy III, komórki strefy I są krótsze około 2.6 razy. W strefie III szerokość komórek epidermy jest większa (o około 11%) w stosunku do komórek ze strefy I (**Ryc.15b**). Prawdopodobnie hipokotyl rośnie również na grubość.



Ryc.15. (a) Długość komórek epidermy mierzona w hipokotylach w trzech strefach: strefie I (5-15mm), strefie II (15-25mm) oraz strefie III (25-35mm). Wszystkie wartości różniły się statystycznie (test t-Studenta, p=0.05).

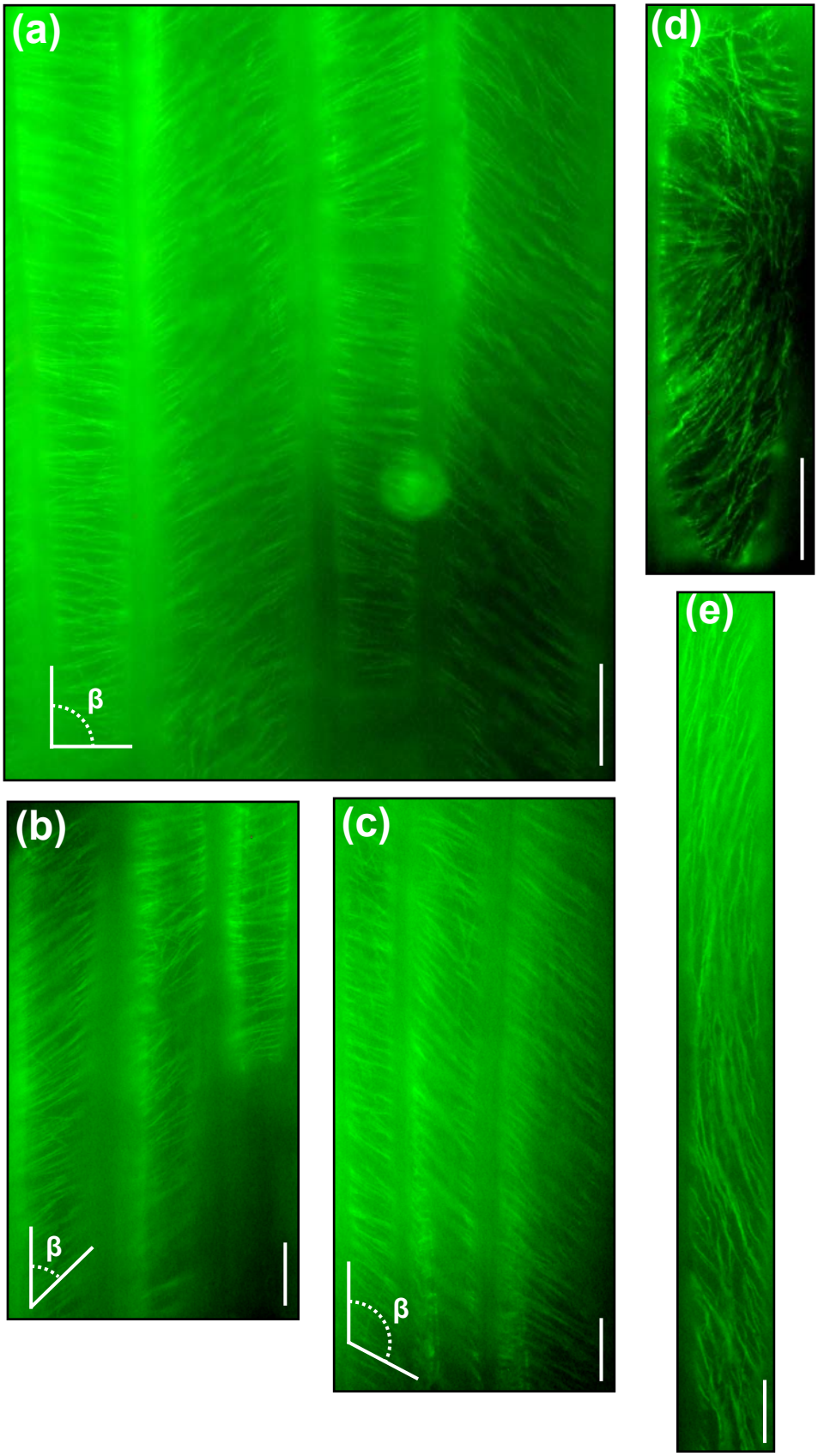


Ryc.15. (b) Szerokość komórek epidermy mierzona w hipokotylach w trzech strefach: strefie I (5-15mm), strefie II (15-25mm) oraz strefie III (25-35mm). Wszystkie wartości różniły się statystycznie (test t-Studenta, p=0.05).

1.2 Ogólna charakterystyka mikrotubul kortykalnych

W niniejszej pracy analizowano wyłącznie MTk leżące pod zewnętrzną ścianą peryklinalną komórek epidermy. Należy jednak zaznaczyć, że wiązki MTk były widoczne również na innych ścianach, przy czym układ MTk widoczny na jednej ścianie przechodził w sposób ciągły na ścianę sąsiednią. Ze względu na zastosowana metodę, MTk były uwidocznione tylko na komórkach przeciętych, a więc we fragmentach komórek leżących po obu stronach nacięcia. Brano pod uwagę fragmenty stanowiące przynajmniej połowę komórki (strefa I i II) lub jedną trzecią komórki (strefa III).

W większości badanych fragmentów komórek (około 90%) MTk uwidocznione w mikroskopie fluorescyjnym były wzajemnie równoległe, w związku z czym dany fragment komórki można było scharakteryzować określonym kątem nachylenia (β) względem kierunku osiowego wyznaczonego przez podłużne ściany komórkowe (**Ryc.16a,b,c).** Około 10% fragmentów komórek nie miało równoległych MTk. Często w takich przypadkach widoczny był gradient kąta nachylenia MTk z „przejściem chiralnym", w którym układ skośny MTk typu Z zmieniał się na S, albo odwrotnie (**Ryc.16d,e**), przechodząc albo przez kierunek poprzeczny (**Ryc.16d**) albo przez kierunek podłużny (**Ryc.16e**).



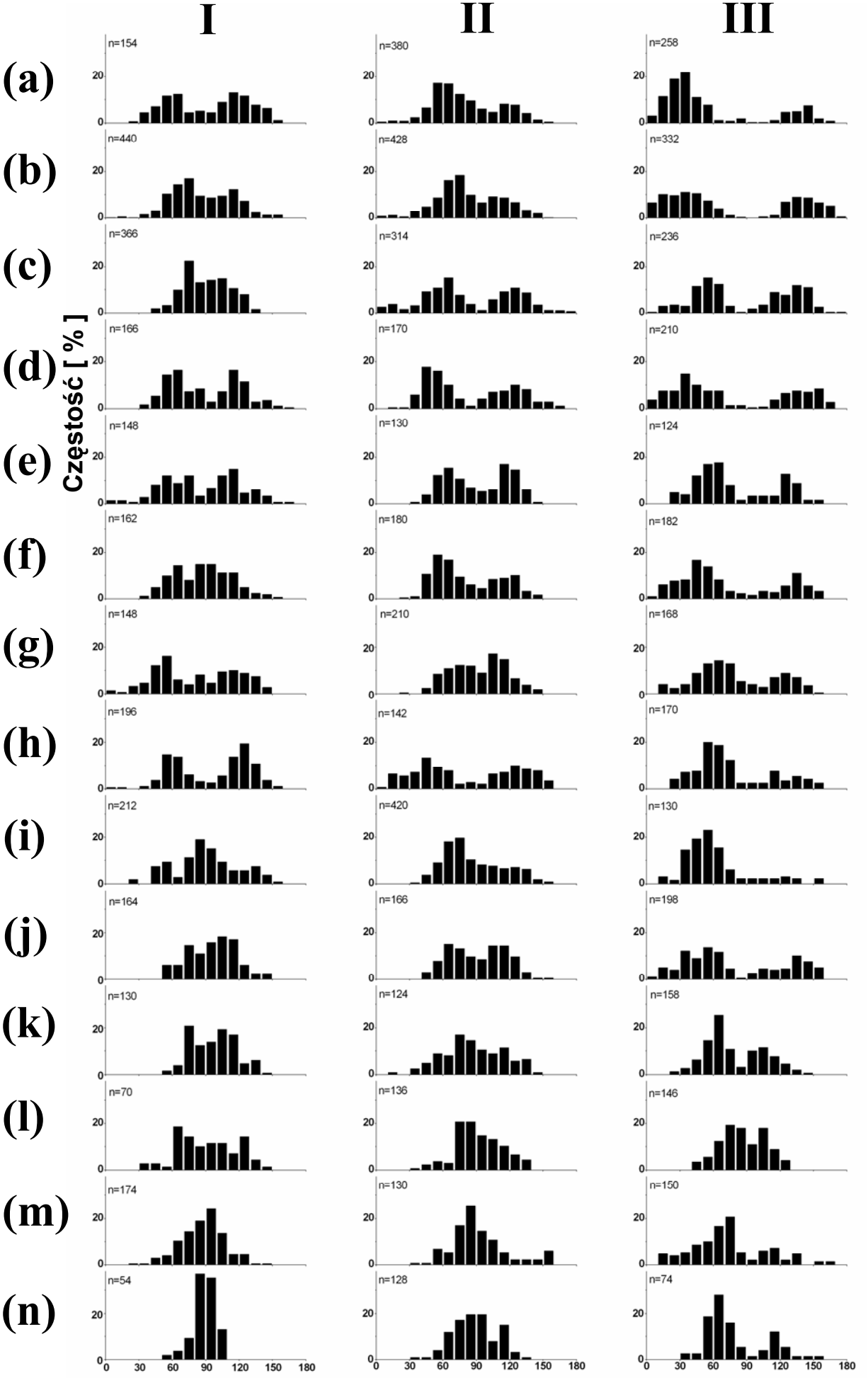
Ryc.16. Mikrotubule kortykalne pod zewnętrzną ścianą peryklinalną epidermy hipokotyla słonecznika. Równoległe wiązki MTk są nachylone pod określonym kątem β względem długiej osi komórki. Układy MTk mogą przyjmować zmienną orientację w obrębie kilku komórek (**a**), lub jednakową orientację, na przykład: orientację skośną typu Z (**b**), orientację skośną typu S (**c**). Orientacja MTk może się zmieniać w obrębie jednej komórki: układ skośny typu Z przechodzi w układ skośny typu S, lub na odwrót, z „przeskokiem" przez kierunek poprzeczny (**d)** lub przez kierunek podłużny (**e**). Skala: 10 µm.

1.3. Orientacja mikrotubul kortykalnych w epidermie *in situ*

Orientacja MTk (której miarą jest kąt β) w populacji komórek na małych obszarach może być jednakowa (**Ryc.16b,c**), najczęściej jednak jest zmienna; często różni się nawet w sąsiadujących komórkach (**Ryc.16a**). Charakterystykę tej zmienności w populacji komórek przedstawiono w postaci histogramu rozkładu częstości występowania kątów nachylenia β.

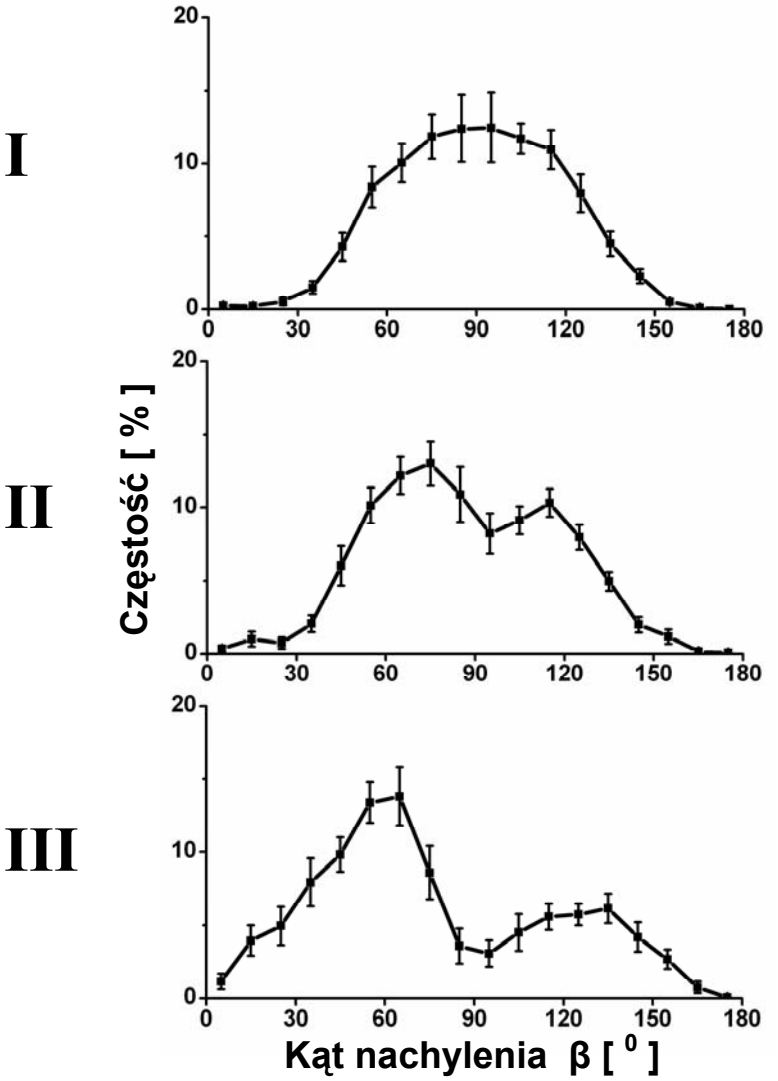
Rycina 17 przedstawia histogramy dla 14 hypokotyli w poszczególnych strefach. W strefie I, tylko niektóre histogramy (**Ryc.17. I i,m,n)** posiadają maksimum przy orientacji poprzecznej, reszta histogramów posiada albo jedno maksimum przesunięte w kierunku orientacji skośnej typu Z (**Ryc.17 I b,c**) lub typu S (**Ryc.17. I h,j**) albo dwa maksima położone symetrycznie (**Ryc.17. I a,d**). Mniejsza zmienność istnieje w strefie II, gdzie maksimum przy orientacji skośnej typu Z występuje w 10 przypadkach (**Ryc.17. II a,b,c,d,f,h,i,k,l,m**), przy orientacji poprzecznej w jednym przypadku (**Ryc.17. II n**).W strefie III wszystkie histogramy posiadają maksimum przy orientacji typu Z (**Ryc.17. III a-n**).

Ogólnie, można stwierdzić, że w strefie I występują histogramy typu A, AB oraz sporadycznie typ B. Histogramy w tej strefie są symetryczne lub nieznacznie asymetryczne typu Z lub S. W strefie II histogramy mają charakter typu AB, B i sporadycznie A. W większości przypadków zaznacza się słaba asymetria typu Z. W strefie III wyraźnie dominuje typ B (jeden wyjątek typ AB), przy czym asymetria w kierunku orientacji skośnych Z jest pogłębiona. Częstość występowania orientacji MTk o bardziej stromym nachyleniu (tj. bliższych kierunkowi podłużnemu niż poprzecznemu) wzrasta w kierunku bazalnym, jednocześnie maleje częstość występowania orientacji poprzecznych.


I
II
III
(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
(g)
(h)
(i)
(j)
(k)
(l)
(m)
(n)
n=154
n=380
n=258
n=440
n=428
n=332
n=366
n=314
n=236
n=166
n=170
n=210
n=148
n=130
n=124
n=162
n=180
n=182
n=148
n=210
n=168
n=196
n=142
n=170
n=212
n=420
n=130
n=164
n=166
n=198
n=130
n=124
n=158
n=70
n=136
n=146
n=174
n=130
n=150
n=54
n=128
n=74
0
20
0 30 60 90 120 150 180
Częstość [%]
Kąt nachylenia β [0]

← Ryc.17.

Z histogramów zbiorczych (**Ryc.18**) przedstawiających wartości średnie częstości występowania kątów nachylenia, zebranych z 14 hipokotyli, jasno wynika, że orientacja MTk w komórkach epidermy zależy od położenia wzdłuż hipokotyla. Zbiorczy histogram charakteryzujący strefę I jest symetryczny, z maksimum przypadającym na orientację poprzeczną a układy skośne typu Z i S występują z podobną częstością. W histogramie strefy II pojawia się tendencja do przesunięcia maksimum w kierunku orientacji skośnej typu Z (tj. 60^0-80^0), przy czym w klasie 90^0-100^0 pojawia się lokalne minimum, a w klasie110^0-120^0 lokalne maksimum; histogram jest więc asymetryczny. W strefie II proporcja pomiędzy częstością występowania orientacji skośnych Z i S wynosi 5 : 4. Tendencja ta zostaje pogłębiona w strefie III, gdzie główne maksimum występuje przy nachyleniu 50^0-70^0 a proporcja pomiędzy częstością występowania orientacji skośnych typu Z i S wynosi 5 : 2.



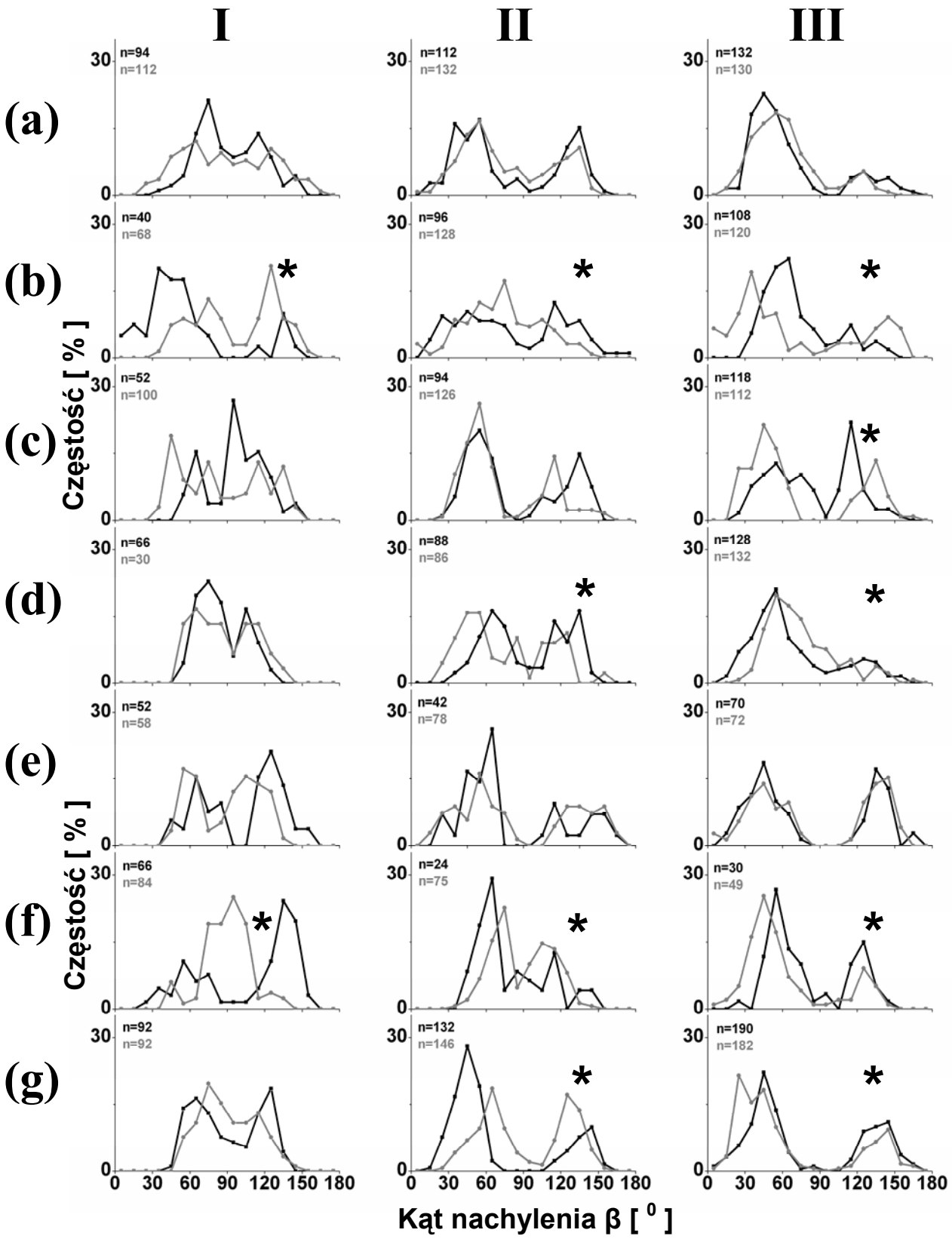
Ryc. 18. Histogramy zbiorcze przedstawiające rozkład częstości występowania kątów β w strefie **I**, **II**, **III** epidermy *in situ*. Każdy punkt reprezentuje wartość średnią (±SE) dla danej klasy kątowej z 14 hipokotyli.

Z porównania histogramów zbiorczych (**Ryc.18**) z histogramami dla pojedynczych hipokotyli (**Ryc.17**) wynika więc, że te pierwsze odzwierciedlają jedynie tendencje układów MTk w przyjmowaniu określonych orientacji, natomiast zatarciu ulegają pewne informacje, które mogą być istotne dla późniejszej interpretacji właściwości tych układów.

1.5. Zmienność orientacji mikrotubul kortykalnych z uwzględnieniem kierunku obwodowego

Układy MTk wykazują również zmienność w kierunku obwodowym (**Ryc.19)**. Rozkłady częstości występowania kątów nachylenia MTk w dwóch pasach epidermy pochodzących z jednego hipokotyla mogą być różne. Zastosowany test Kołmogorowa-Smirnowa (p=0.01) wykazał, że około 50% par rozkładów (**Ryc.19. I b,f, II b,d,f,g, III b-d,f,g**) w określonej strefie w poszczególnych hipokotylach wykazują różnice istotne statystycznie. Jednakże, różnice statystyczne zostały wykazane nawet w histogramach, które nie różniły się typem, na przykład na **Ryc.19. II d,f, III f,g**. Tylko w 27% przypadków wskazanych przez test, typ histogramów uległ wyraźniej zmianie: w strefie I, w jednym hipokotylu występowały typy B_Z i AB (**Ryc.19. I b**) oraz A i B_S (**Ryc.19. I f**), w strefie II występują typy AB i B (**Ryc.19. II b**).

Pomimo wykazanych w teście statystycznym różnic pomiędzy poszczególnymi histogramami z pary pasów epidermy, ogólnie można stwierdzić, iż typ histogramu jest zachowany w większości, tj. w ponad 80% przypadków.



Ryc.19. Porównanie rozkładów częstości występowania kątów β pod zewnętrzną ścianą peryklinalną w dwóch pasach epidermy *in situ* pochodzących ze wspólnego hipokotyla w strefie **I, II, III**. Zbadano 7 hipokotyli (**a-g**). „n" to liczba pomiarów. Gwiazdką oznaczono rozkłady, które różniły się między sobą statystycznie (test Kołmogorowa-Smirnowa, p=0.01).

2. ZMIANY ORIENTACJI MIKROTUBUL KORTYKALNYCH SPOWODOWANE IZOLACJĄ PASÓW EPIDERMY Z HIPOKOTYLA

Izolowane pasy (o długości ponad 30mm i szerokości około 1mm) zawierały oprócz epidermy również warstwę subepidermy i zwykle 1-2 warstwy miękiszu. Takie pasy trzymane na bibule filtracyjnej z niebuforowaną pożywką MS wykazywały żywotność co najmniej przez 26 godzin po izolacji, co przejawiało się obecnością MTk zarówno w komórkach epidermy jak i w komórkach miękiszowych leżących poniżej.

Zabieg izolacji powodował jednak zmiany w układzie MTk. Czasowo-przestrzenny aspekt tych zmian był przedmiotem badań, których wyniki przedstawione są w niniejszym rozdziale. Histogramy zbiorcze na **Ryc.20** przedstawiają rozkłady częstości występowania kątów β będące uśrednieniem wyników uzyskanych z 14-10 pasów epidermy (dla każdego wariantu), które po wyizolowaniu z hipokotyla, były następnie trzymane przez 0.5, 1, 2, 4, 6 oraz 12, 14, 16, 18h na bibule filtracyjnej z niebuforowaną pożywką MS.

Układ MTk ulega reorientacji we wszystkich trzech strefach już w pół godziny od momentu wyizolowania z hipokotyla (**Ryc.20. I-III b**). Zmiany w orientacji MTk w 0.5h są najwyraźniejsze w strefie I (**Ryc.20. Ib**), gdzie częstość występowania orientacji podłużnych i bardziej stromych ulega znacznemu zwiększeniu, w wyniku czego histogram typu A charakterystyczny dla epidermy *in situ* (**Ryc.20. I a**) przekształca się w typ C z maksimum przy orientacjach podłużnych (**Ryc.20. I b**). Podobne przesunięcie maksima histogramu widoczne jest w 0.5h w strefie II (**Ryc.20. II b**). W strefie III brak jest wyraźnego maksimum a cały rozkład jest „wypłaszczony" (**Ryc. 20. III b**). Reorientacja MTk po izolacji epidermy przebiega tutaj wolniej, bowiem w ponad 40% badanych pasach epidermy rozkład częstości występowania kątów β po 0.5h jest podobny do tego występującego *in situ* (dane nie pokazane). Dla porównania, w strefie I i II zmiana kształtu histogramów względem histogramów *in situ* wystąpiła we wszystkich badanych przypadkach.

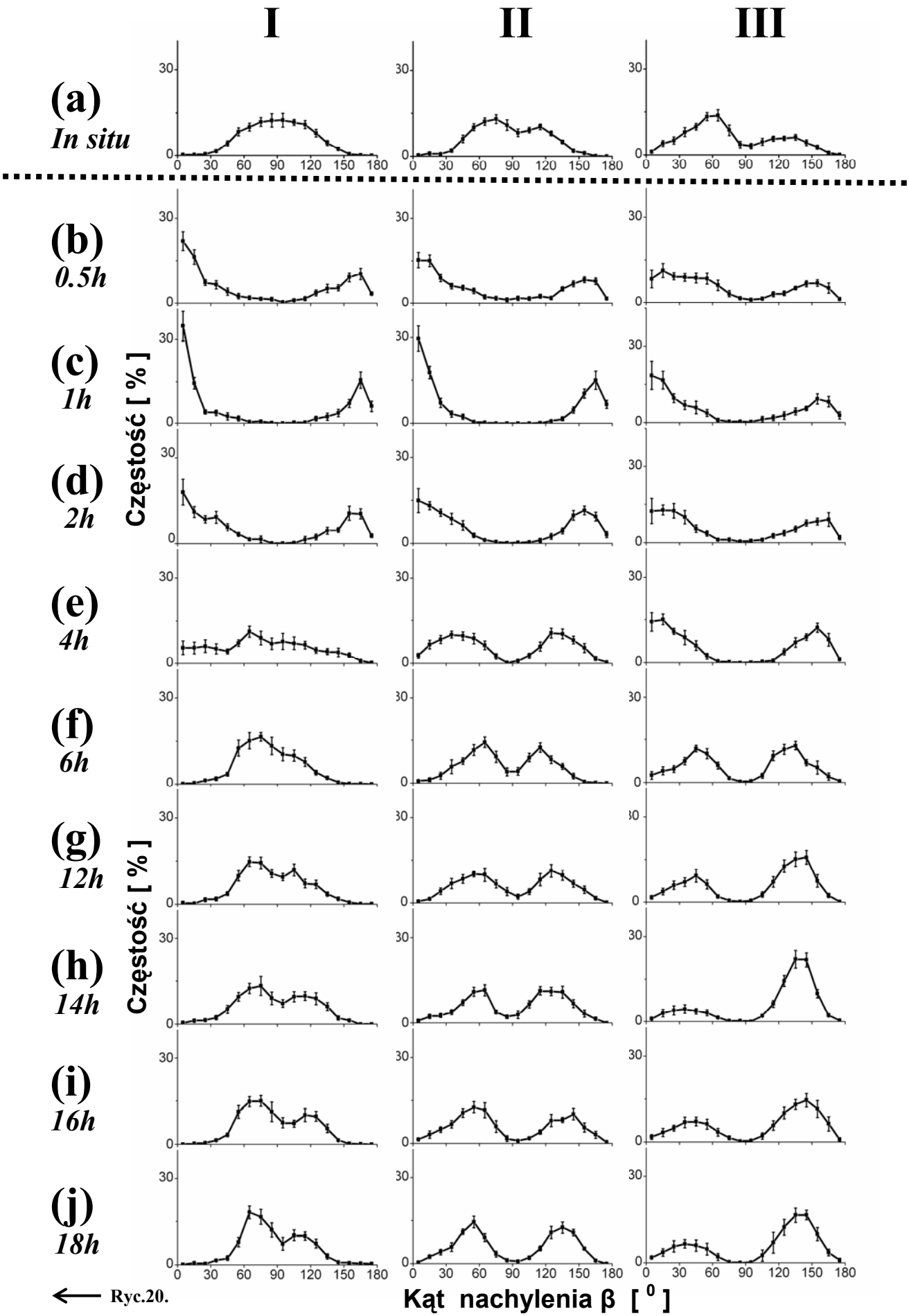
Po jedno godzinnej inkubacji pasów epidermy w pożywce MS już we wszystkich trzech strefach w histogramach występuje maksimum przy orientacji podłużnej (**Ryc.20. I-III c**).

Po dwu godzinnej inkubacji pasów epidermy następuje zmiana tendencji w reorganizacji MTk: częstość występowania układów podłużnych we wszystkich strefach ulega zmniejszeniu w porównaniu ze stanem po 1h (**Ryc.20. I-III d)**. Ta tendencja jest kontynuowana w ciągu dalszych 4 godzin.

W 4h po izolacji epidermy, w histogramie strefy I maksimum występuje przy orientacji skośnej typu Z, tj. 60^0-70^0 (**Ryc.20. I e**), przy czym pozostałe zakresy kątów (od 0^0 do 160^0) są również licznie obsadzone. W strefie II i III w histogramach dominują układy skośne (**Ryc.20. II-IIIe**), przy czym w strefie III, 15% wszystkich układów stanowią nadal układy podłużne, podczas gdy w strefie II ich procent wynosi jedynie 3 (dane nie pokazane).

W szóstej godzinie po izolacji (**Ryc.20. I-III f**), w strefie I, II, III rozkład częstości występowania kątów β jest zbliżony do rozkładu *in situ*. W strefie I dominują układy poprzeczne i skośne w zakresie 50^0-130^0 (**Ryc.20. If**). Jednak w przeciwieństwie do epidermy *in situ*, w 6h po izolacji, maksimum znajduje się przy orientacji skośnej typu Z, tj. w zakresie 70^0-80^0, co czyni histogram asymetrycznym względem kierunku poprzecznego, tj. typu AB_Z (**Ryc.20. I f)**. W strefie II i III występują symetryczne histogramy typu B (**Ryc.20. II-III f**). Na uwagę zasługuje fakt, że w strefie III nie obserwuje się dominacji układów skośnych typu Z, tak licznych w tej strefie w epidermie *in situ*. W poszczególnych pasach epidermy jedynie w jednym na dziesięć przypadków histogram w tej strefie był asymetryczny, tj. typu B_Z (dane nie pokazane).

Dalsze badania dotyczyły pasów epidermy inkubowanych w pożywce MS przez 12,14,16 i 18h od momentu izolacji z hipokotyli (**Ryc.20. I-III g-j**). Przez ten czas, w histogramach strefy I pojawiło się lokalne minimum przy orientacji poprzecznej, z zachowaniem asymetrii całego rozkładu (**Ryc.20. I g-j**). W strefie II rozkłady częstości występowania kątów β nie uległy większej zmianie w porównaniu z 6-godzinną inkubacją (**Ryc.20. II g-j**). Natomiast w histogramach strefy III zaznaczyła się asymetria (**Ryc.20. III g-j**): maksimum występuje przy orientacji 130^0-150^0, czyli dominują tutaj skośne układy typu S, co oznacza odwrócenie typu asymetrii w porównaniu ze stanem *in situ*, gdzie dominowały układy typu Z.


I
II
III
(a)
In situ
(b)
0.5h
(c)
1h
(d)
2h
(e)
4h
(f)
6h
(g)
12h
(h)
14h
(i)
16h
(j)
18h
Częstość [%]
Częstość [%]
0 30 60 90 120 150 180
Kąt nachylenia β [0]

← Ryc.20.

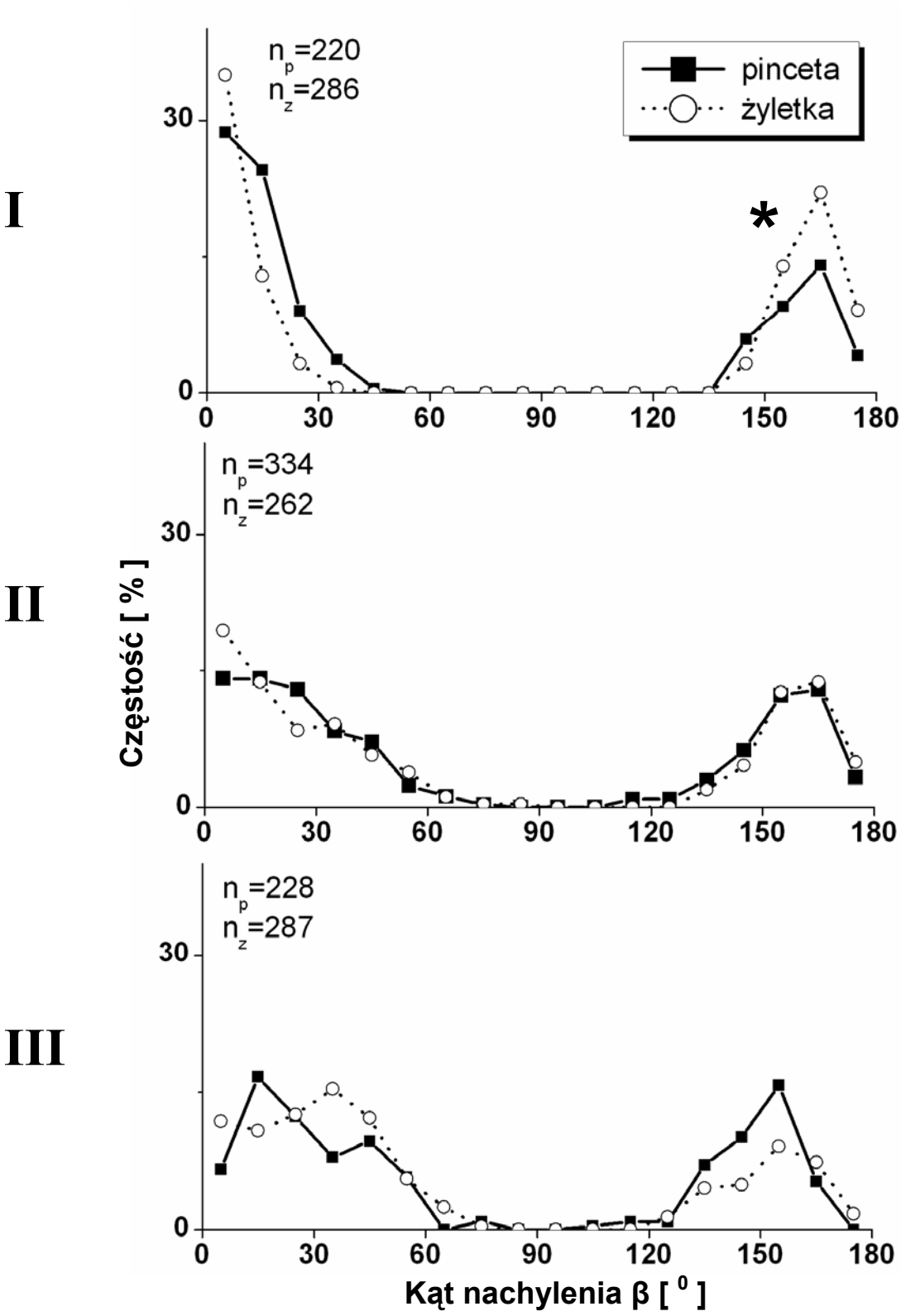
Podsumowując, układ MTk po izolacji epidermy z hipokotyla ulega reorientacji: orientacje poprzeczne i skośne zostają zastąpione orientacjami podłużnymi i bardziej stromymi. Szybkość reorientacji zależy od strefy. Najszybciej reorientacja przebiega w strefie I, najwolniej w strefie III. Po 2h od momentu izolacji układy MTk ulegają dalszej reorientacji lecz o tendencji przeciwnej. W efekcie po 6h MTk przyjmują orientację albo poprzeczną albo skośną, przez co zostaje osiągnięty stan przypominający układ *in situ*, który jednak w ciągu kolejnych godzin ulega pewnym zmianom. Powyżej 12h od momentu izolacji w strefie I dominują układy skośne typu Z, w strefie II układy skośne typu Z i S występują z podobną częstością, zaś w strefie III dominują układy skośne typu S.

Przestawione powyżej badania stanowiły podstawę do wniosku, że po 12h układ MTk w izolowanych pasach jest na tyle stabilny, aby mógł być poddawany wpływom czynników badanych w niniejszej pracy.

3. WPŁYW SPOSOBU ODDZIELANIA PASÓW EPIDERMY Z HIPOKOTYLA NA REORIENTACJĘ MIKROTUBUL KORTYKALNYCH PO IZOLACJI

Podczas pobierania z hipokotyla, pasy epidermy są poddane naprężeniu rozciągającemu, wynikającemu z techniki oddzielania epidermy za pomocą pincety; istnieje podłużna składowa w sile przyłożonej do pasa podważanego pincetą. Prawdopodobnym było więc to, że obserwowane zmiany w układzie MTk po izolacji są następstwem wprowadzenia czynnika mechanicznego w postaci naprężenia. Zastosowano zatem inną metodę izolacji pasa epidermy z hipokotyla: poprzez wycięcie pasa za pomocą żyletki. Wyizolowane pasy inkubowano następnie przez 1h w niebuforowanej pożywce MS.

Histogramy przedstawiające rozkłady częstości występowania kątów β w pasach epidermy wycinanych żyletką oraz tych pobieranych standartowo za pomocą pincety są bardzo podobne: dominują układy podłużne i skośne (**Ryc.21. I-III**). Zastosowany test Kołmogorowa-Smirnowa ($p=0.01$) wykazał, że histogramy w strefach II i III otrzymane dwoma metodami nie różnią się statystycznie; w strefie I pomiędzy histogramami istnieje różnica, która jednakże nie jest związana ze zmianą typu histogramów, dotyczy jedynie kilkoprocentowej różnicy w częstości występowania orientacji skośnych.



Ryc.21. Wpływ sposobu oddzielania pasów epidermy z hipokotyla na reorientację MTk po jednej godzinie od izolacji.

Histogramy zbiorcze, przedstawiające rozkład częstości występowania kątów β pod zewnętrzną ścianą peryklinalną dla dwóch pasów epidermy pobieranych z hipokotyla pincetą i dwóch pasów wycinanych żyletką. Pasy epidermy były inkubowane przez 1h w niebuforowanej pożywce MS. Histogramy reprezentują strefę **I**, **II**, **III**. „n_p i n_z" to liczba pomiarów w epidermie pobieranej, odpowiednio, pincetą i żyletką.

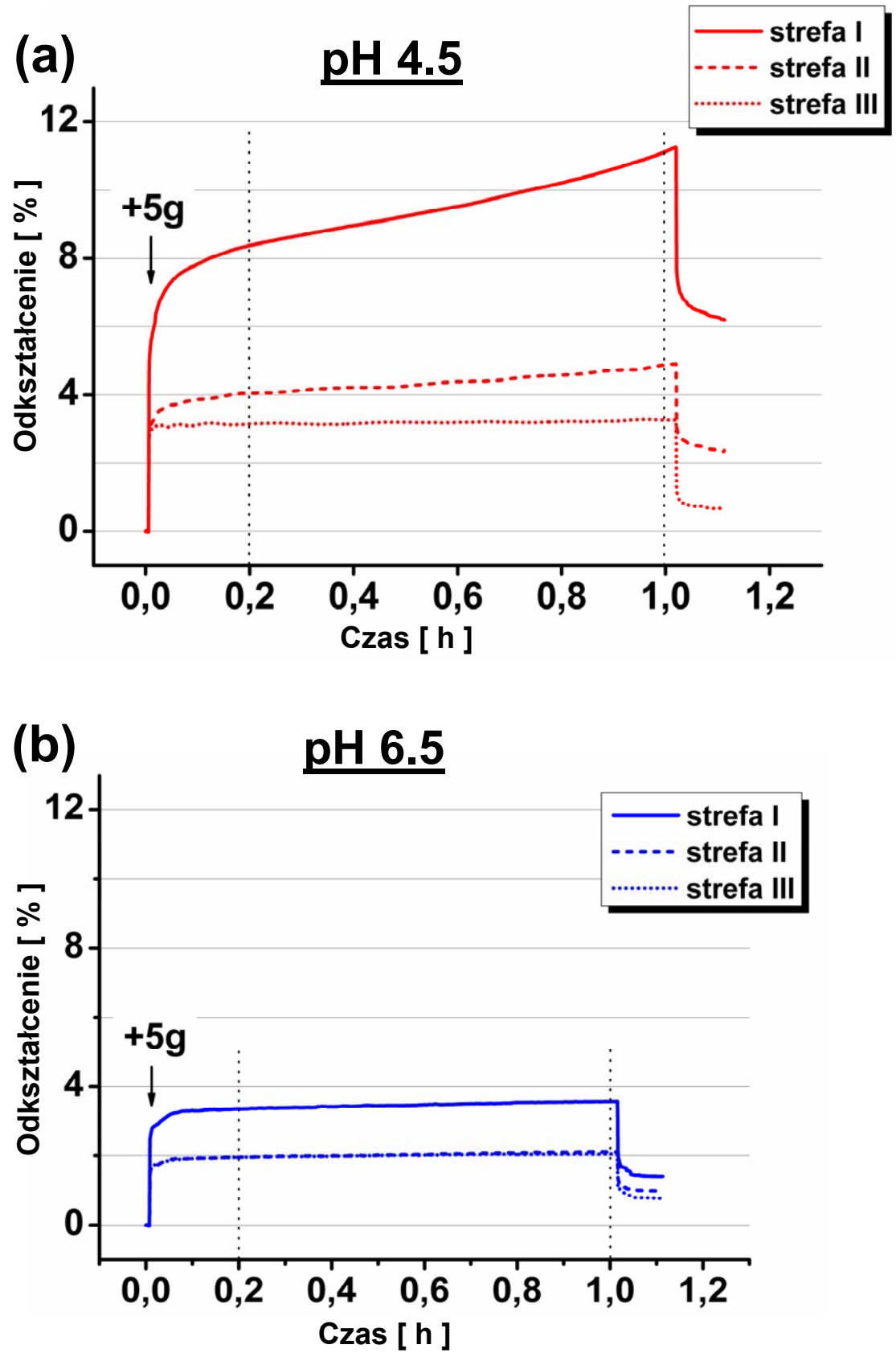
4. WPŁYW pH I NAPRĘŻENIA ROZCIĄGAJĄCEGO NA WZROST WYDŁUŻENIOWY IZOLOWANYCH PASÓW EPIDERMY

Pasy epidermy (o szerokości około 1mm) po wyizolowaniu z hipokotyla były inkubowane przez 12-14h w buforowanej pożywce MS o pH 4.5 i 6.5 (bufor MES lub fosforanowy); następnie przykładano do nich siłę rozciągającą (poprzez dołożenie ciężarka) i mierzono odkształcenie (**Ryc.22**). Badania wstępne wykazały, że rodzaj buforu nie wpływa na szybkość wzrostu pasów epidermy (dane nie pokazane).

Gwałtowny przyrost względnej długości (podłużnego odkształcenia) spowodowany przyłożeniem siły polega na prostowaniu pasa i na jego elastycznym odkształceniu (**Ryc.22 a, b**). Dalszy powolny wzrost długości jest nieodwracalny, stanowi więc wzrost pasa na długość (wzrost wydłużeniowy). Miarą szybkości wzrostu wydłużeniowego jest nachylenie linii odkształcenia w funkcji czasu. Linia ta była prosta w czasie > 0.2h od momentu przyłożenia siły; szybkość wzrostu wyznaczano więc w czasie od 0.2 do1h.

Rycina 22a pokazuje wykresy zależności odkształcenia od czasu dla reprezentatywnego pasa epidermy rozciąganego z siłą 0.05N przy pH 4.5 w trzech strefach I,II,III. Widać, że odkształcenie pasa jest różne w badanych strefach. Największe odkształcenie występuje w strefie I, najmniejsze zaś w strefie III. W strefie III odkształcenie w czasie 0.2-1h nie ulega zwiększeniu. Przy pH 6.5 (**Ryc.22b**) odkształcanie w strefie I jest największe, przy czym we wszystkich trzech strefach przyrost odkształcenia w czasie 0.2-1h jest znikomy.

Po odjęciu siły, odkształcenie nie zanika w żadnej ze stref, jednakże nie należy tego wiązać tylko i wyłącznie z odkształceniem plastycznym. Część zachowanego odkształcenia można przypisać prostowaniu pasa epidermy bezpośrednio po przyłożeniu siły, nie zastosowano bowiem naprężenia wstępnego badanego pasa, część odkształcenia ma charakter wiskoelastyczny i jest związana ze zmianą równowagi osmotycznej. Widać, że odkształcenie zależy od pH.

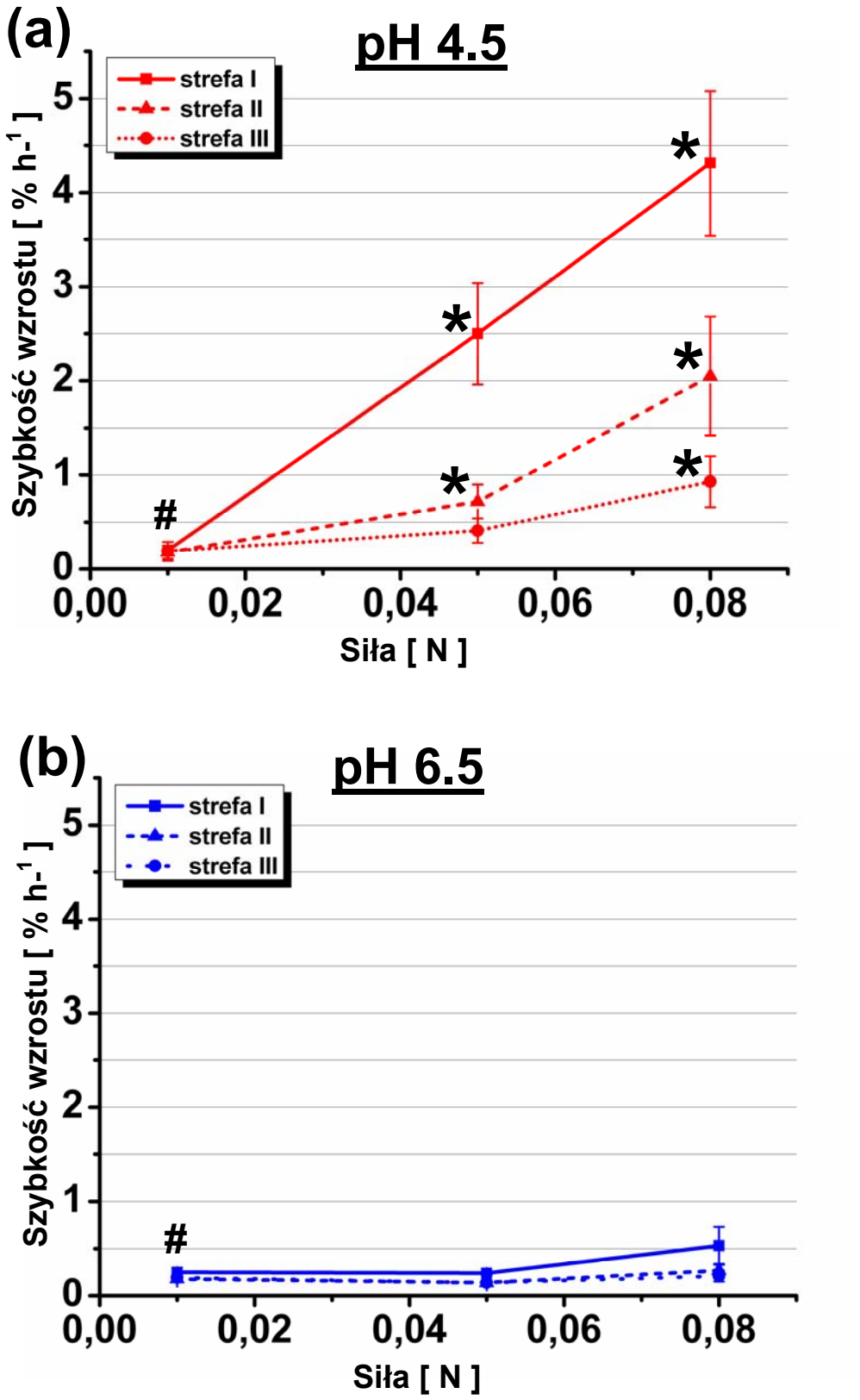


Ryc.22. Kinetyka odkształcenia reprezentatywnych pasów epidermy naprężanych siłą 0.05N przy pH 4.5 (**a**) oraz pH 6.5 (**b**) w różnych strefach.
Pasy epidermy po wyizolowaniu z hipokotyla były inkubowane w buforowanej (MES, 20mM) pożywce MS o pH 4.5 (**a**) oraz pH 6.5 przez 12-14h a następnie naprężane przez 1h. W każdym pasie wyróżniono strefę I, II, III. Strzałką oznaczono moment przyłożenia siły. Liniami przerywanymi zaznaczono zakres (od 0.2 do 1h), w którym obliczano szybkość wzrostu.

Szybkość wzrostu pasa epidermy zależy nie tylko od strefy i pH ale również od wielkości przyłożonej siły (**Ryc.23**). Przy pH 4.5 szybkość wzrostu rośnie wraz z siłą (**Ryc.23a**): przy sile 0.01N w strefach I,II,III szybkość wzrostu jest bliska zeru, po przyłożeniu siły 0.05N i 0.08N szybkość wzrostu ulega zwiększeniu we wszystkich trzech strefach. Najszybciej rośnie strefa I (średnio 2.50 i 4.31% h^{-1} przy sile, odpowiednio, 0.05 i 0.08N), wolniej strefa II (średnio 0.72 i 2.05% h^{-1} przy sile, odpowiednio, 0.05 i 0.08N) a najwolniej strefa III (0.41 i 0.93% h^{-1} przy sile, odpowiednio, 0.05 i 0.08N). Test Studenta (p=0.05) nie stwierdził istotnych różnic w szybkości wzrostu strefy III przy sile 0.05N porównaniu z siłą 0.01N.

Wielkość przyłożonej siły nie wpływa na szybkość wzrostu przy pH 6.5 (**Ryc.23b**): w strefie I,II,III szybkość wzrostu, niezależnie od siły, jest bliska 0% h^{-1}. Wyjątek stanowi strefa I naprężana z siłą 0.08N, w której średnia szybkość wzrostu wynosi 0.53% h^{-1}, jednak test Studenta (p=0.05) nie stwierdził istotnych różnic porównaniu z siłą 0.01N.

Podsumowując; przy pH 4.5 izolowane pasy epidermy rosną, gdy tylko są poddane dostatecznie dużemu naprężeniu rozciągającemu. Wzdłuż pasa istnieje gradient szybkości wzrostu: najszybciej przyrasta strefa I, najwolniej strefa III. Przy pH 6.5 wzrost praktycznie nie występuje. Najmniejsza zastosowana siła (0.01N) powoduje nieznaczną szybkość wzrostu, nie większą niż 0.2% h^{-1} (przy pH 4.5), stąd można wysunąć wniosek, że nienaprężane pasy epidermy nie rosną lub rosną z nieznaczną szybkością.



Ryc.23. Zależność szybkości wzrostu izolowanych pasów epidermy od przyłożonej siły przy pH 4.5 (**a**) i 6.5 (**b**) w różnych strefach.
Pasy epidermy po wyizolowaniu z hipokotyla były inkubowane przez 12-14h w buforowanej pożywce MS o pH 4.5 (**a**) i pH 6.5 (**b**) [bufor MES, 20mM - przy naprężaniu z siłą 0.01 i 0.05N, bufor fosforanowy, 20mM - przy naprężaniu z siłą 0.08N]. W każdym pasie wyróżniono strefę I, II, III. Wykresy przedstawiają wartości średnie ± SE z 8-13 pasów ($n_{0.01N}$=8, $n_{0.05N}$=12, $n_{0.8N}$=13). Gwiazdką oznaczono wartości dla określonej strefy przy naprężaniu siłą 0.05 i 0.08N, które różniły się statystycznie (test t-Studenta, p=0.05) od wartości przy sile 0.01N oznaczonej #.

5. ORIENTACJA MIKROTUBUL KORTYKALNYCH W IZOLOWANYCH PASACH EPIDERMY RÓŻNIĄCYCH SIĘ SZYBKOŚCIĄ WZROSTU MODULOWANĄ ZA POMOCĄ pH I NAPRĘŻENIA

Badania przeprowadzono na pasach epidermy wyizolowanych ze wspólnego hipokotyla; w ten sposób zminimalizowano zmienność orientacji MTk wynikającą ze zmienności w populacji hipokotyli. Histogramy na **Ryc.24-27** przedstawiają pary izolowanych pasów epidermy (pochodzące z 9-13 hipokotyli), inkubowanych przez 12-14h w buforowanej pożywce MS o pH 4.5 i 6.5 (bufor MES lub fosforanowy, 20mM); następnie, jeden z pasów był naprężany z siłą 0.05 lub 0.08N przez 1h, drugi z pasów (traktowany jako kontrola) nie był naprężany.

Gdy pasy były naprężane z siłą 0.05N przy pH 4.5, czyli w warunkach, w których izolowane pasy rosną (**Ryc.24**), test Kołmogorowa-Smirnowa wykazuje różnice istotne statystycznie pomiędzy 48% parami histogramów (dla pasa naprężanego i nienaprężanego), brak jest jednak określonych tendencji w zmianie histogramu Na przykład, w strefie I pasów naprężanych, w jednym przypadku częstość występowania poprzecznych orientacji zmniejsza się w porównaniu do pasa kontrolnego, czyli po naprężaniu następuje zmiana typu histogramu z A do AB (**Ryc.24. I b**); zaś w drugim przypadku, typ AB histogramu ulega zmianie do typu A, czyli częstość występowania poprzecznych orientacji zwiększa się po naprężaniu (**Ryc.24. I d**). W strefie II, typ AB przechodzi w typ B w pasach naprężanych (**Ryc.24. II b,g**), w strefie III typ BC zmienia się w typ B (**Ryc.24. III h**). W pozostałych przypadkach, w których test Kołmogorowa-Smirnowa wykazał różnice istotne statystycznie, typ histogramu nie ulega większej zmianie.

Po naprężaniu z siłą 0.05N przy pH=6.5, czyli w warunkach, w których izolowane pasy nie rosną (**Ryc.25**), różnice istotne statystycznie występują w 33% parach histogramów. Tutaj podobnie, jak przy pH 4.5, nie było określonej tendencji w zmianie typu histogramu, częstość występowania orientacji poprzecznych rosła po naprężaniu (**Ryc.25 I a, b, i)** lub malała **(Ryc.25. I h)**.

Przy pH 4.5 w pasach naprężanych z siłą 0.08N, czyli rosnących ze znaczną szybkością (**Ryc.26**) 44% par histogramów wykazuje różnice istotne statystycznie. Stwierdza się zarówno zwiększenie orientacji poprzecznych w pasach naprężanych w stosunku do pasów kontrolnych, (**Ryc.26. I c, k**), jak i ich zmniejszenie (**Ryc.26. I j**).

Przy pH 6.5 w pasach naprężanych z siłą 0.08N (**Ryc.27**), gdy naprężanie nie powodowało znacznego wzrostu, w 39% przypadkach wykazano różnice istotne

statystycznie. Zmiany te są wynikiem zmniejszenia częstości występowania orientacji poprzecznych w pasach naprężanych w stosunku do pasów kontrolnych, (**Ryc.27. I e, h, k),** jak i zwiększenia częstości tych orientacji (**Ryc.27. II k**).

Podsumowując, częstość występowania różnic statystycznych pomiędzy histogramami reprezentującymi pasy naprężane i nienaprężane, rosnące i nie rosnące, nie jest większa niż częstość występowania różnic wykazana w epidermie *in situ* w kierunku obwodowym. Zmiany w typie histogramów występują z niewiele większą częstością w pasach naprężanych i kontrolnych w porównaniu do epidermy *in situ*, przy czym w obu przypadkach najczęściej pojawiają się w strefie I, najrzadziej zaś w strefie III. Zarówno po naprężaniu z siłą 0.05N jaki i 0.08N przy różnych wartościach pH zmiana w typie histogramów nie ma określonego charakteru.

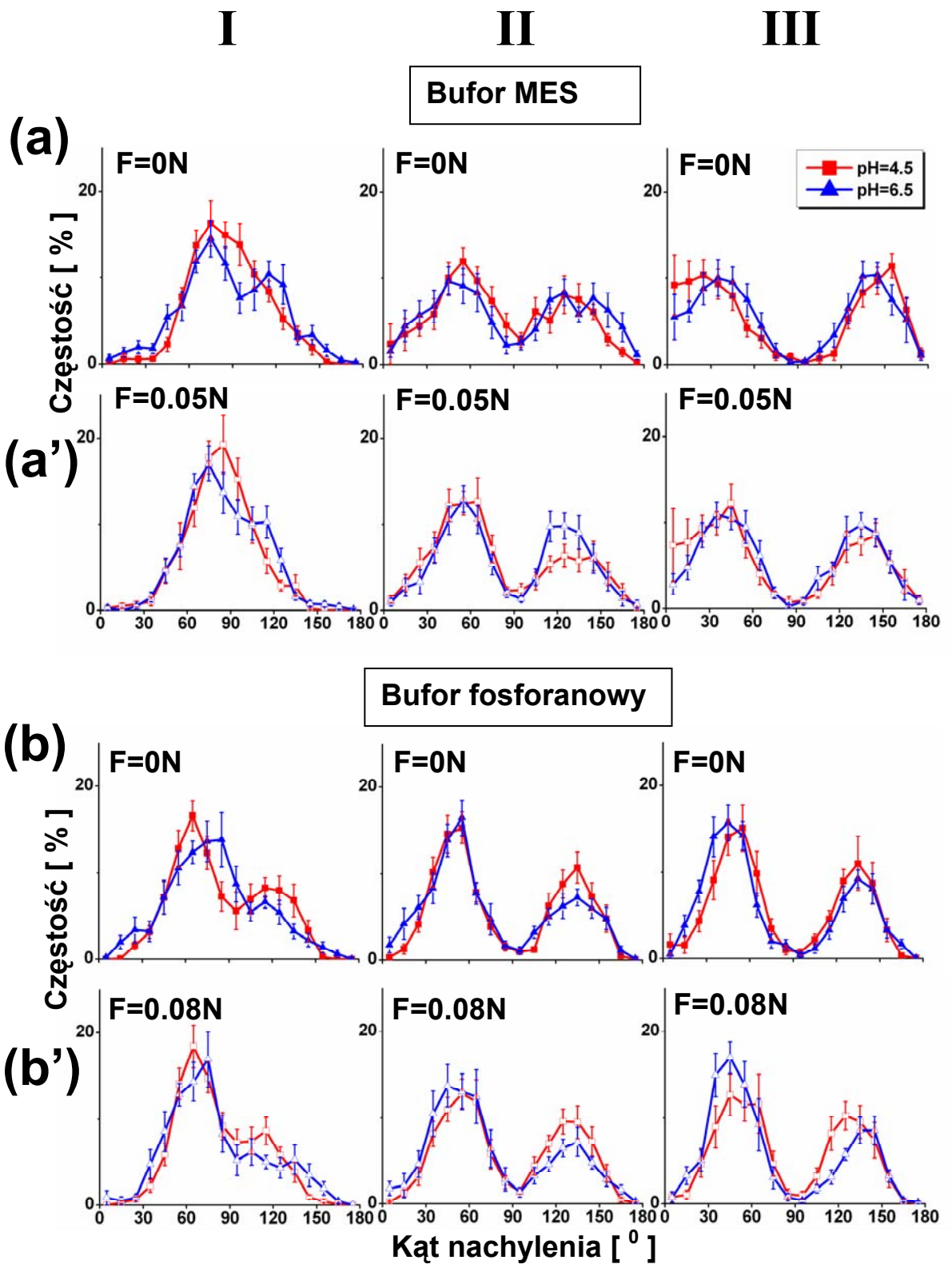
6. WPŁYW pH NA ORIENTACJĘ MIKROTUBUL KORTYKALNYCH W IZOLOWANYCH PASACH EPIDERMY

Z histogramów na **Ryc.24-27** sporządzono histogramy zbiorcze tak aby porównać wpływ dwu stosowanych pH (**Ryc.28**). Z porównania wynika, że pH roztworu, w którym izolowane pasy były inkubowane, nie ma większego wpływu na orientację MTk. Rozkłady częstości występowania kąta β przy pH 4.5 w pasach kontrolnych (nienaprężanych) i naprężanych mają bardzo zbliżoną postać w porównaniu do tych przy pH 6.5, dotyczy to zarówno buforu MES (**Ryc.28. I-III a, a'**), jaki i buforu fosforowego (**Ryc.28. I-III b,b'**). W większości przypadków, w rozkładach dla pH 4.5 oraz 6.5 wartości średnie z poszczególnych klas znajdują się w zakresie lub na granicy błędów standardowych (SE).

Niezależnie od pH i naprężenia, pewne różnice w orientacji MTk są widoczne pomiędzy buforem MES (**Ryc.28. I-III a, a'**) i buforem fosforanowym (**Ryc.28. I-III b,b'**). W strefie I histogramy dla buforu MES posiadają jedno główne maksimum (**Ryc.28. I a, a'**), zaś w histogramach buforu fosforanowego występują dodatkowe lokalne maksima (**Ryc.28. Ib. b'**). W strefie III w buforze MES (**Ryc.28. III a, a'**) częstość występowania orientacji podłużnych jest większa o około 2-6 razy niż w buforze fosforanowym (**Ryc.28. III b'b'**).

Wpływ roztworu inkubującego na orientację MTk widoczny jest ponadto w częstości występowania układów skośnych typu Z i S w strefie III pasów inkubowanych na niebuforowanej i buforowanej pożywce MS. Po 12-18h inkubacji na niebuforowanej pożywce MS w strefie III dominują układy skośne typu S (**Ryc.20. III g-j**), zaś po 12-14h inkubacji na buforowanej pożywce MS (niezależnie od rodzaju bufora) częstość występowania układów skośnych typu Z i S jest mniej więcej równa (**Ryc.28. III a, a'** oraz **b'** dla pH 4.5) lub z nieznaczną przewagą układów typu Z (**Ryc.28. III b** oraz **b'** dla pH 6.5).

Zmierzono ciśnienie osmotyczne (π) stosowanych roztworów i otrzymano następujące wyniki: dla niebuforowanej pożywki MS π wynosi 150mOsm kg $^{-1}$, dla buforowanej (bufor MES, 20mM) pożywki MS o pH 4.5 i 6.5, π wynosi odpowiednio, 172 i 184 mOsm kg $^{-1}$, dla buforowanej (bufor fosforanowy, 20mM) pożywki MS o pH 4.5 i 6.5, odpowiednio, 147 i 154 mOsm kg $^{-1}$.



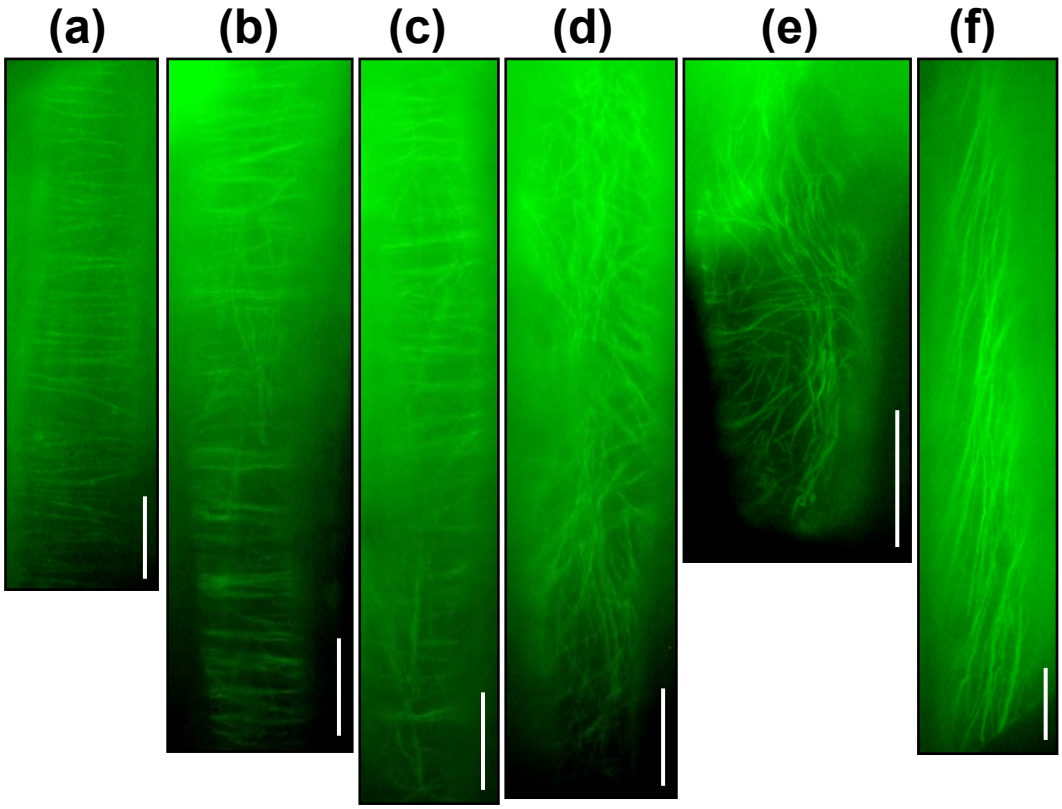
Ryc.28. Histogramy zbiorcze przedstawiające rozkłady częstości występowania kątów nachylenia β pod zewnętrzną ścianą peryklinalną izolowanych pasów epidermy, inkubowanych przez 12-14h w buforowanej (bufor MES [**a, a'**], bufor .fosforanowy [**b, b'**], 20mM) pożywce MS o pH 4.5 i pH 6.5, a następnie naprężanych (z siłą 0.05N [**a'**] i 0.08N [**b'**] na około 1mm szerokości pasa) lub nienaprężanych (kontrolnych), [**a, b**]. Histogramy reprezentują strefę **I**, **II**, **III**. Podano wartości średnie ±SE uzyskane z 9 pasów epidermy (**a, a'**), 13-11 pasów (**b, b'**). Histogramy z poszczególnych pasów zostały przedstawione na Ryc. 24-27.

7. WPŁYW ŚWIATŁA BIAŁEGO NA ORIENTACJĘ MIKROTUBUL KORTYKALNYCH W IZOLOWANYCH PASACH EPIDERMY INKUBOWANYCH PRZEZ 12-14 GODZIN

W związku z brakiem istotnych różnic w orientacji MTk pomiędzy większością pasów naprężanych i nienaprężanych inkubowanych przez 12-14h (Wyniki, rozdział 5), przeprowadzono dodatkowy eksperyment mający na celu sprawdzenie, czy MTk w tych pasach są zdolne do reorientacji, czy też może uległy stabilizacji, wskutek której nie reagują na zmianę naprężenia w ścianach komórkowych. Pasy inkubowano w ciemności w buforowanej pożywce MS o pH 4.5 a następnie naprężano siłą 0.05N przez 1h naświetlając jednocześnie pasy, zarówno naprężane jak i nienaprężane, światłem białym.

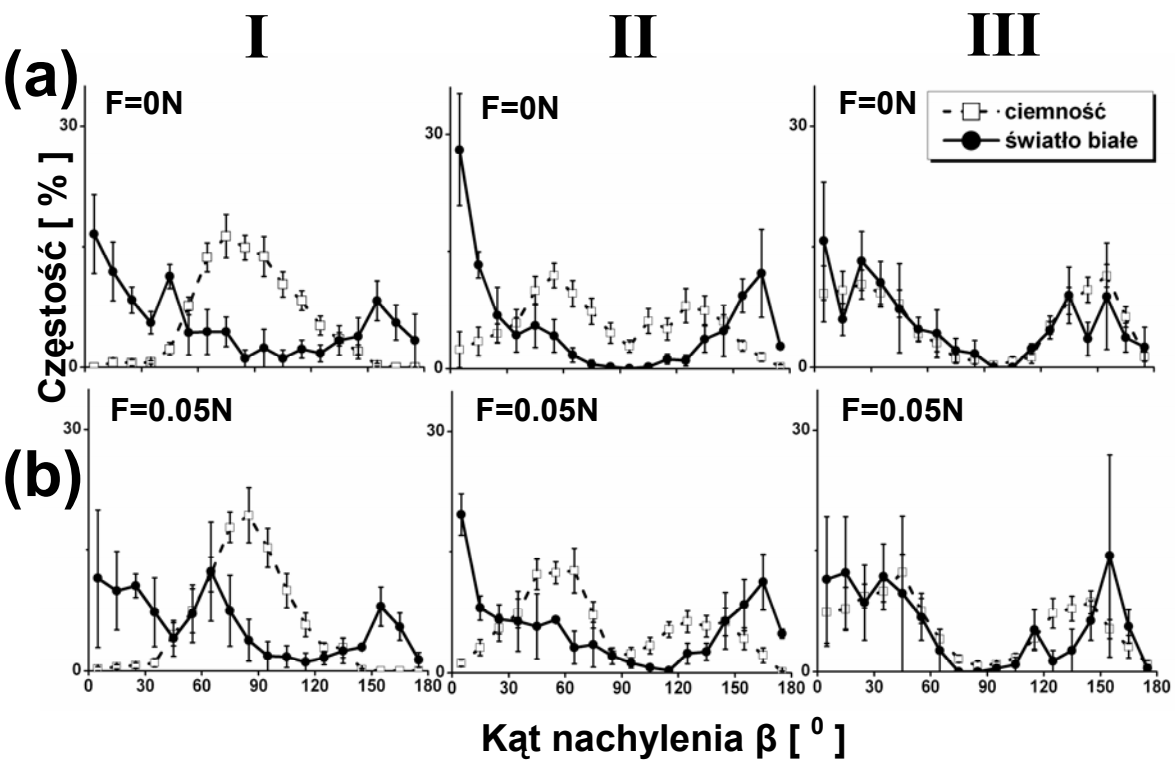
W eksperymencie, w którym wykorzystano oświetlacz o mniejszej mocy nie stwierdzono globalnej przebudowy układu MTk; podobnie jak w przypadku pasów nienaświetlanych, układ równoległych względem siebie MTk był poprzeczny i skośny (**Ryc.29a**). W pasach naświetlonych obserwowano jednak również takie komórki (około 10%), gdzie nie wszystkie wiązki były równoległe (**Ryc.29b, c, d**). Na przykład, w komórkach, w których większość wiązek była zorientowana poprzecznie względem długiej osi komórki, pojedyncze wiązki były zorientowane podłużnie, tj. przecinały pozostałe pod kątem około 90^0 (**Ryc.29b, c**). Sporadycznie obserwowano komórki, w których większość wiązek była ułożonych mniej więcej podłużnie, nadal jednak można było wyróżnić pojedyncze wiązki zorientowane pod innym kątem (**Ryc.29d**).

Po zastosowaniu oświetlacza o większej mocy, światło białe spowodowało widoczną już w całej populacji badanych komórek reorientację MTk (**Ryc.30**). Obserwowano komórki z równoległymi wiązkami MTk o orientacji podłużnej lub stromej (**Ryc.29f**), nadal jednak sporadycznie pojawiały się komórki z wiązkami nierównoległymi (**Ryc.29e**).



Ryc.29. Układy MTk pod zewnętrzną ścianą peryklinalną pasów epidermy hipokotyla słonecznika inkubowanych przez 12-14h w buforowanej pożywce MS o pH 4.5 (bufor MES, 20mM) a następnie naświetlanych światłem białym przez 1h. W **(a–d)** zastosowano oświetlacz halogenowy o mniejszej mocy, w (**e–f**) o większej mocy.

Globalne zmiany orientacji MTk w pasach naświetlanych polegające na znacznym zwiększeniu częstości występowania orientacji podłużnych i bardziej stromych, zarówno w tych naprężanych jak i nienaprężanych (**Ryc.30a,b**), w porównaniu z pasami nienaświetlanymi, są najlepiej zaznaczone strefie I i II; w strefie III w pasach naświetlanych wystąpił tylko niewielki wzrost częstości występowania orientacji podłużnych. Mając na uwadze wykazaną wcześniej zmienność orientacji MTk pomiędzy hipokotylami i niewielką liczbę przebadanych pasów (n=3), różnice w kształcie histogramu dla naświetlanych pasów naprężanych i nienaprężanych można uznać za przypadkowe. Nie ulega natomiast wątpliwości, że MTk w izolowanych pasach inkubowanych przez 12-14 h na pożywce MS są zdolne do reorientacji.



Ryc.30. Histogramy zbiorcze przedstawiające rozkład częstości występowania kątów nachylenia β w strefie **I**, **II**, **III** pasów inkubowanych przez 12-14h w buforowanej pożywce MS (bufor MES, 20mM) a następnie naprężanych (siłą 0.05N) [**b**] lub nienaprężanych (**a**) z jednoczesnym naświetlaniem światłem białym przez 1h. Każdy punkt reprezentuje wartość średnią (± SE) dla danej klasy kątowej z 3 hipokotyli (światło białe) oraz 9 hipokotyli (ciemność, dane z Ryc. 28).

8. WPŁYW FUZIKOKCYNY NA WZROST WYDŁUŻENIOWY IZOLOWANYCH PASÓW EPIDERMY PREINKUBOWANYCH PRZEZ 12-14 GODZIN

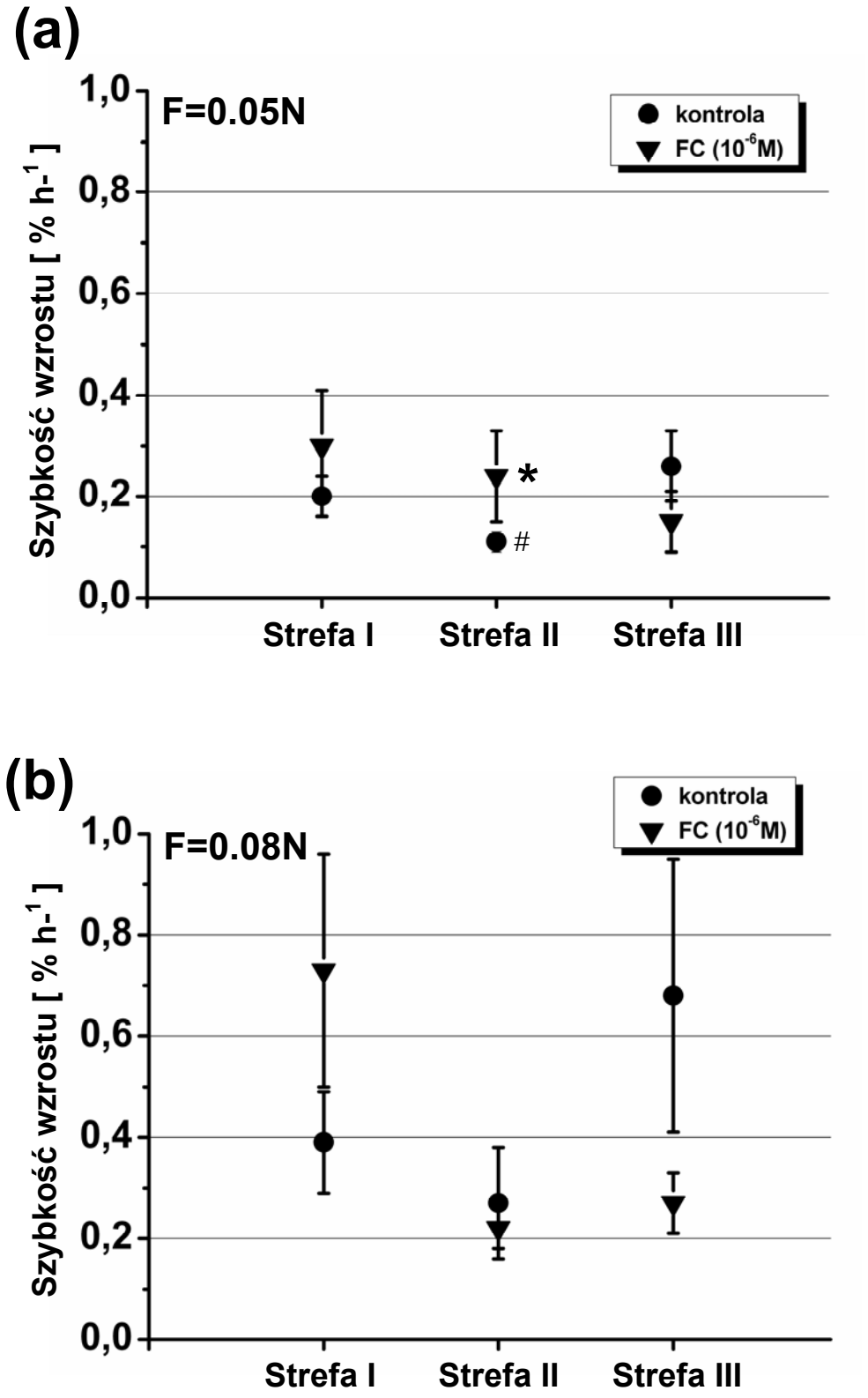
Fuzikokcyna (FC) w koncentracji 10^{-6}M w porównaniu z kontrolnymi pasami (niebuforowana pożywka MS) nie powoduje znacznego zwiększenia szybkości wzrostu wydłużeniowego naprężanych pasów epidermy preinkubowanych przez 12-14h w niebuforowanej pożywce MS (**Ryc.31**).

Przy zastosowaniu siły 0.05N w obecności FC szybkość wzrostu zwiększyła się dwukrotnie jedynie w strefie II, w porównaniu do kontrolnych pasów i różnica ta jest istotna statystycznie (**Ryc.31a**); generalnie szybkość wzrostu pasów, niezależnie od obecności FC, zawiera się w granicach 0.11-0.3% h^{-1} a obserwowane różnice w wartościach nie są istotne (za wyjątkiem strefy II). Również przy zastosowaniu siły 0.08N (**Ryc.31b**), FC nie ma wpływu na szybkość wzrostu pasów preinkubowanych przez 12-14h. Pomimo różnic w średnich wartościach wzrostu pomiędzy FC i kontrolą, test t-Studenta wykazał, że różnice te nie są istotne statystycznie, w próbach bowiem istnieje duży rozrzut poszczególnych pomiarów wokół wartości średniej.

Zwiększenie koncentracji FC do 10^{-5}M nie powoduje istotnego statystycznie zwiększenia szybkości wzrostu pasów w porównaniu do kontroli i do FC w koncentracji 10^{-6}M (**Tab.2**).

Tab.2. Średnia szybkość wzrostu wydłużeniowego (±SE) izolowanych pasów epidermy. Pasy były preinkubowane przez **12-14h** w niebuforowanej pożywce MS a następnie naprężane przez 1h z siłą 0.08N przy różnej koncentracji FC (10^{-6} lub 10^{-5}M). Dla kontrolnych pasów (pożywka MS) n_{kontr}=5, FC (10^{-6}M) n_{FC6}=7, FC (10^{-5}M) n_{FC5}=4. Wartości średnie nie różniły się statystycznie (test t-Studenta, p=0.05)

	kontrola	**FC (10^{-6}M)**	**FC (10^{-5}M)**
Strefa I	**0.39 ± 0.10**	**0.73 ± 0.23**	**0.80 ± 0.40**
Strefa II	**0.27 ± 0.11**	**0.22 ± 0.04**	**0.44 ± 0.25**
Strefa III	**0.68 ± 0.27**	**0.27 ± 0.06**	**0.36 ± 0.17**

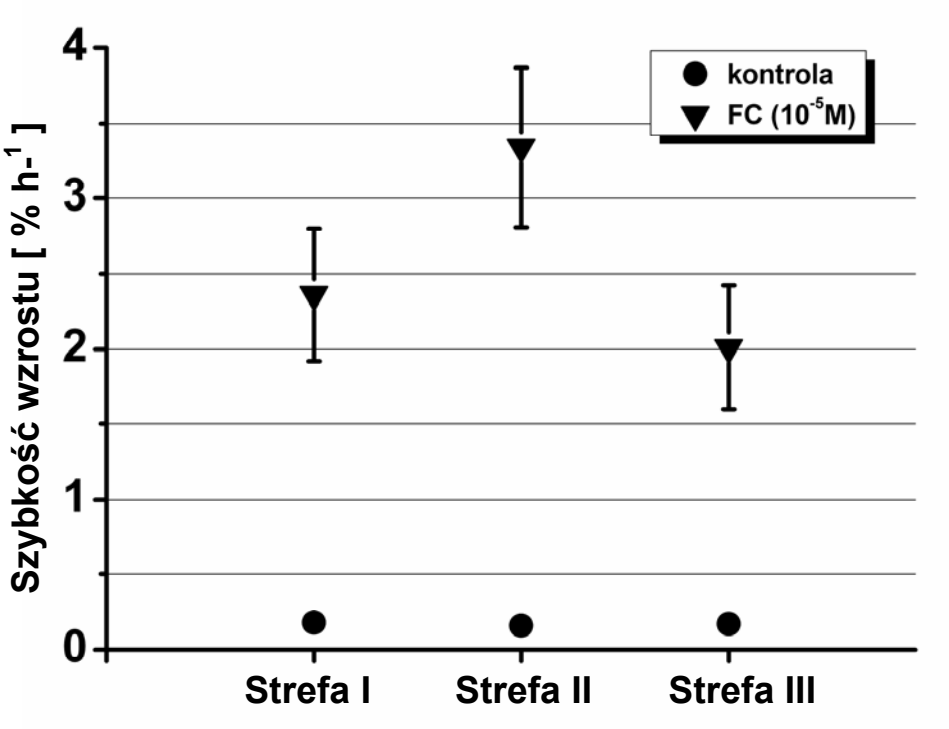


Ryc.31. Wpływ fuzikokcyny (10^{-6}M) na szybkość wzrostu wydłużeniowego izolowanych pasów epidermy. Pasy były preinkubowane przez **12-14h** w niebuforowanej pożywce MS a następnie naprężane przez 1h z siłą 0.05N (**a**) lub 0.08N (**b**) w pożywce MS z FC lub bez FC (kontrola). W każdym pasie wyróżniono strefę **I**, **II**, **III**. Wykresy przedstawiają wartości średnie ±SE z 3-9 pasów (pożywka MS: $n_{0.05N}$=9, $n_{0.8N}$=5, FC: $n_{0.05N}$=3, $n_{0.8N}$=7). Gwiazdką oznaczono wartość, która różniła się statystycznie (test t-Studenta, p=0.05) od wartości oznaczonej #.

9. WPŁYW FUZIKOKCYNY NA WZROST WYDŁUŻENIOWY IZOLOWANYCH PASÓW EPIDERMY PREINKUBOWANYCH PRZEZ 1 GODZINĘ

W związku z brakiem wpływu FC na wzrost pasów preinkubowanych przez 12-14h, czas preinkubacji skrócono do 1h, przypuszczano bowiem, że długi czas preinkubacji spowodował utratę wrażliwości na FC. Pasy epidermy preinkubowano w szalce z roztworem niebuforowanej pożywki MS, po czym przeniesione zostały do przyrządu, w którym były naprężane siłą 0.08N.

Fuzikokcyna (10^{-5}M) zwiększa znacząco szybkość wzrostu naprężanych pasów preinkubowanych przez 1h (**Ryc.32**). Podczas gdy szybkość wzrostu w kontrolnych pasach (tj. inkubowanych w niebuforowanej pożywce MS bez FC) niezależnie od strefy jest mniejsza niż 0.2 % h^{-1}, to inkubacja w pożywce z FC powoduje zwiększenie szybkości wzrostu średnio do około 2-3 % h^{-1}, przy czym tutaj również szybkość wzrostu nie zależy od strefy (test t-Studenta, p=0.05). Pasy nienaprężane (n=3) nie rosną nawet w obecności FC (dane nie pokazane).



Ryc.32. Wpływ fuzikokcyny (10^{-5}M) na szybkość wzrostu wydłużeniowego izolowanych pasów epidermy. Pasy były preinkubowane przez **1h** w niebuforowanej pożywce MS, w której swobodnie pływały, a następnie naprężane przez 1h z siłą 0.08N w pożywce MS z FC lub bez FC (kontrola). W każdym pasie wyróżniono strefę **I**, **II**, **III**. Wykresy przedstawiają wartości średnie ±SE z 8-13 pasów (n_{kontr}=8, n_{FC5}=13). Wszystkie wartości otrzymane dla FC różniły się statystycznie (test t-Studenta, p=0.05) od wartości otrzymanych dla kontroli w danej strefie.

10. ORIENTACJA MIKROTUBUL KORTYKALNYCH W IZOLOWANYCH PASACH EPIDERMY RÓŻNIĄCYCH SIĘ SZYBKOŚCIĄ WZROSTU ZALEŻNĄ OD FUZIKOKCYNY

Badania przeprowadzono na parach pasów epidermy wyizolowanych ze wspólnego hipokotyla. Histogramy na **Ryc.33, 34** przedstawiają pary izolowanych pasów epidermy (pochodzące z 11 hipokotyli), preinkubowanych przez 1h w szalce z niebuforowaną pożywką MS; następnie, po przeniesieniu do przyrządu, inkubowanych w pożywce z FC lub bez FC (kontrola), przy czym jeden z pasów był naprężany z siłą 0.08N przez 1h, drugi zaś nie był naprężany.

Gdy pasy były naprężane siłą 0.08N na bibule z pożywką MS bez FC (czyli w warunkach, w których pasy nie wydłużały się znacząco, [kontrola]) test Kołmogorowa-Smirnowa wykazuje różnice istotne statystycznie pomiędzy 36% parami histogramów (**Ryc.33**). W strefie I zmiany w orientacji MTk polegają na zwiększeniu częstości występowania orientacji poprzecznych i mniej stromych (**Ryc.33. I b, h**). W strefie II i III w większości przypadków wykazujących różnice istotne statystycznie, typ histogramu albo nie ulega większej zmianie (**Ryc.33. II a, b, f, h, III d, i**), albo następuje zwiększenie częstości występowania orientacji podłużnych, czyli typ B histogramu przechodzi w typ BC po naprężaniu (**Ryc.33. II i, III a**) lub typ BC w typ C (**Ryc.33. II k**).

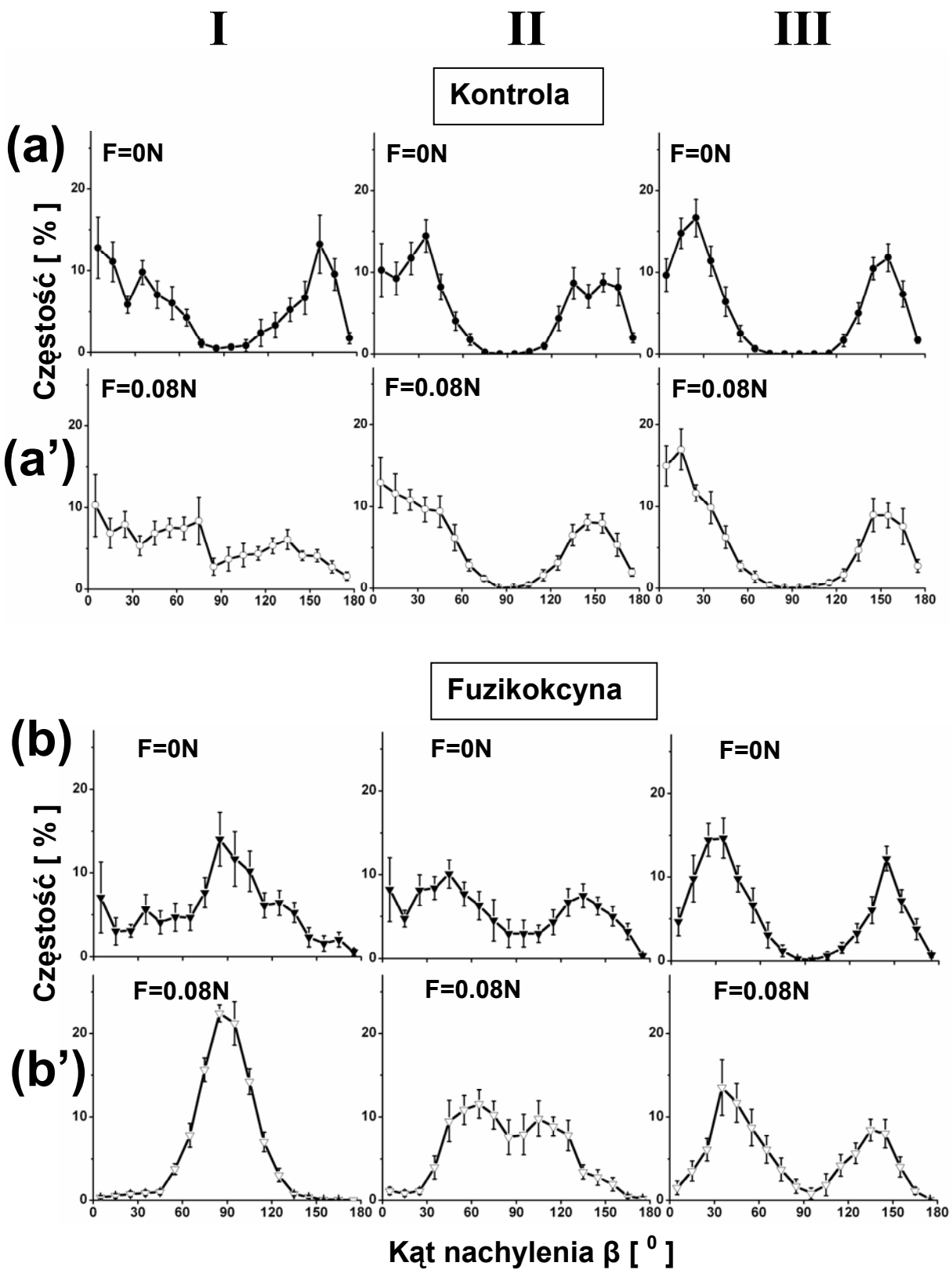
Gdy pasy były naprężane siłą 0.08N na bibule z FC (10^{-5}M), czyli w warunkach, w których pasy wydłużały się ze znaczną szybkością we wszystkich trzech strefach, 67% histogramów wykazuje różnice istotne statystycznie (**Ryc.34**). Wśród tych histogramów, w większości przypadków (powyżej 60%) następuje zmiana typu histogramów, przy czym zmiana ta ma określoną tendencję: częstość występowania orientacji poprzecznych i mniej stromych ulega zwiększeniu w pasach naprężanych w porównaniu z pasami nienaprężanymi, zanikają zaś układy podłużne. Na przykład: w strefie I typ AB przechodzi w typ A po naprężaniu (**Ryc.34. I c**), typ B w typ A (**Ryc.34. I g**) oraz typ BC w typ A (**Ryc.34. I d, j**). Podobna tendencja utrzymuje się w strefie II: typ B przechodzi w typ A po naprężaniu (**Ryc.34. II d, h**) lub w typ AB (**Ryc.34. II c**), typ D w typ A (**Ryc.34. II a**), typ BC w typ B (**Ryc.34. II e, j**), podobnie zresztą jak w strefie III (**Ryc. 34. III d, k**).

Wymienione powyżej tendencje są również widoczne na histogramach zbiorczych reprezentujące wartości średnie częstości występowania kątów β, zebranych z 11 hipokotyli (**Ryc.35**). Naprężanie pasów epidermy inkubowanych na pożywce MS bez FC (kontrola) nie zmienia zasadniczo kształtu histogramu w strefie II i III, obserwuje się jedynie kilkuprocentowy przyrost częstości występowania orientacji podłużnych (**Ryc.35. II, III a, a'**). W strefie I pasów naprężanych zanika minimum przy orientacji poprzecznej widoczne w pasach nienaprężanych (**Ryc.35. I a, a'**).

Naprężanie pasów inkubowanych na pożywce z FC powoduje zmianę kształtu histogramów we wszystkich strefach. W strefie I pasów nienaprężanych w obecności FC maksimum histogramu przypada na orientację poprzeczną, jednakże orientacje skośne i podłużne są również licznie reprezentowane (**Ryc.35. I b**). Histogramy dla pasów nienaprężanych z poszczególnych hipokotyli należą do różnych typów: typu A (**Ryc.34. I a, b, e, k**), typu AB (**Ryc.34. I c, f)** i typu BC **(Ryc.34. I d, j)**. W pasach naprężanych dominują układy poprzeczne (**Ryc.35. I b'**), zaś wszystkie histogramy z poszczególnych hipokotyli należą do typu A (**Ryc.35. I a-k**).

W strefie II pasów nienaprężanych inkubowanych na pożywce z FC wszystkie orientacje występują z większą lub mniejszą częstością (**Ryc.35. II b**), co jest wynikiem występowania różnych typów histogramów z poszczególnych hipokotyli: typu A (**Ryc.34. II b**), typu B (**Ryc.34. II c, d, f, g, h, i, k**), typu BC (**Ryc.34. II e, j**), typu D (**Ryc.34. II a**). Po naprężaniu, w pasach następuje zanik orientacji podłużnych a zwiększenie orientacji porzecznych i mniej stromych (**Ryc.35. IIb'**).

Najmniejsze różnice po naprężaniu w pożywce z FC są widoczne w strefie III, gdzie położenie maksima oraz minima nie ulega zmianie, jedynie częstość orientacji mniej stromych wzrasta (**Ryc.35. III b, b'**).



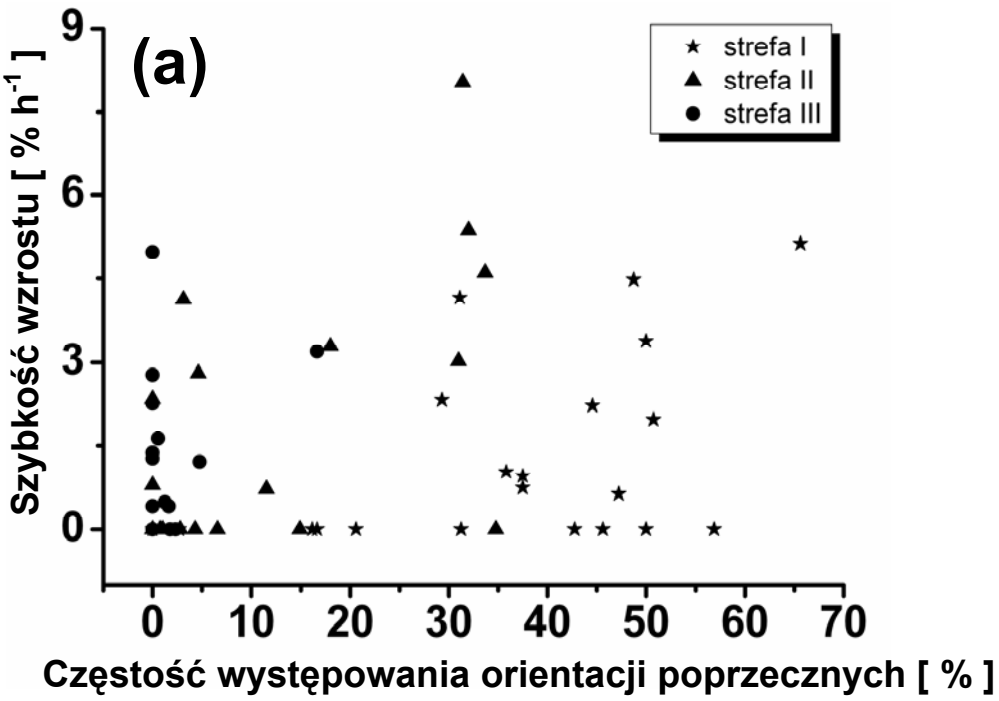
Ryc.35. Histogramy zbiorcze przedstawiające rozkład częstości występowania kątów nachylenia β w strefie **I**, **II**, **III** pasów preinkubowanych przez **1h** w pożywce MS a następnie naprężanych (siłą 0.08N) lub nienaprężanych w pożywce MS z **FC (10^{-5}M)** lub bez FC (**kontrola**). Każdy punkt reprezentuje wartość średnią (±SE) dla danej klasy kątowej z 11 hipokotyli, dla których poszczególne histogramy przedstawiono na Ryc.33 i 34.

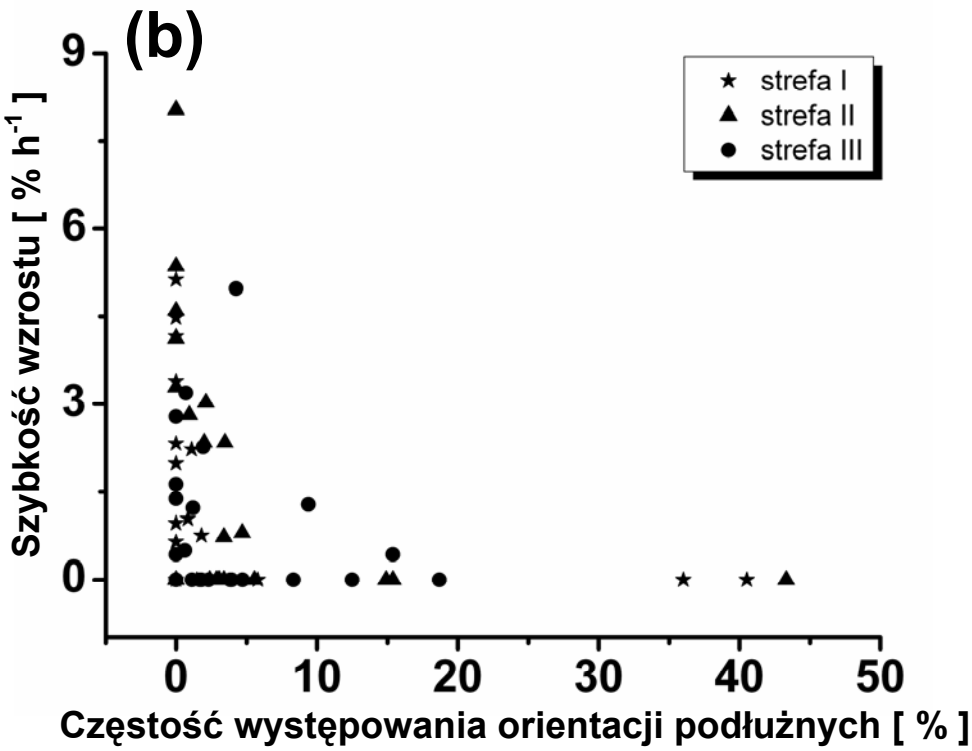
11. ZALEŻNOŚĆ POMIĘDZY CZĘSTOŚCIĄ WYSTĘPOWANIA ORIENTACJI POPRZECZNYCH ORAZ PODŁUŻNYCH I SZYBKOŚCIĄ WZROSTU ZALEŻNĄ OD FUZIKOKCYNY

Podczas naprężania pasów epidermy inkubowanych na pożywce z FC w celu ich późniejszego utrwalenia i wyznakowania MTk, dokonywano jednoczesnego pomiaru ich wydłużania za pomocą ekstensometru. W ten sposób każdy histogram mógł być scharakteryzowany określoną szybkością wydłużania (a nie jedynie jej wartością średnią uzyskanych z niezależnych pomiarów). Dzięki temu możliwa stała się dokładna analiza zależności częstości występowania określonych orientacji i szybkości wzrostu (**Ryc.36a, b**).

Częstość występowania orientacji poprzecznych ($\beta=90^0\pm10^0$) nie zależy od szybkości wzrostu (**Ryc.36a**); takie orientacje występują w różnych strefach pasów nie wydłużających się (nienaprężanych), jak i tych wydłużających się ze znaczną szybkością (powyżej 5% h^{-1}). Jednakże orientacje poprzeczne zawsze liczniej występują w strefie I, a nie występują lub występują bardzo nielicznie w strefie III, pomimo znacznej, w niektórych przypadkach, szybkości wzrostu tej strefy.

Częstość występowania orientacji podłużnych ($\beta=0^0$-10^0, $\beta=170^0$-180^0) w strefach pasów wydłużających się jest najczęściej bliska 0% lub nie przekracza 5% (**Ryc.36b**); zaś w strefach pasów nie wydłużających mieści się w granicach 0-20% (z wyjątkiem trzech przypadków). Występowanie orientacji podłużnych nie jest związane z żadną określona strefą.





Ryc.36. Zależność pomiędzy częstością występowania orientacji poprzecznych (**a**) oraz orientacji podłużnych (**b**) i szybkością wzrostu zależnego od FC (10^{-5}M) izolowanych pasów epidermy. Częstości występowania określonych orientacji pochodzą w wyników przedstawionych w Ryc.34, zaś szybkości wzrostu z Ryc.32.

IV. DYSKUSJA

1. WPŁYW SZYBKOŚCI WZROSTU NA ORIENTACJĘ MIKROTUBUL KORTYKALNYCH. HIPOTEZA SCHOPFERA

Następujące argumenty dają podstawy do falsyfikacji hipotezy Schopfera o zależności między kierunkiem wzrostu i orientacją MTk:

- orientacje poprzeczne i mniej strome występują w nienaprężanych pasach (czyli nie wydłużających się) inkubowanych przez 4-18h w niebuforowanej oraz buforowanej pożywce;

-zwiększenie szybkości wzrostu wydłużeniowego w pasach inkubowanych w buforowanej pożywce (pH 4.5) przez 12-14h poprzez przyłożenie naprężenia rozciągającego nie powoduje zwiększenia częstości występowania orientacji poprzecznych;

-FC powoduje zwiększenie częstości występowania orientacji poprzecznych i mniej stromych w pasach nienaprężanych (niewydłużających się) w porównaniu z próbą kontrolną (bez FC);

-światło białe indukuje reorganizację układu MTk z poprzecznego na podłużny w pasach nienaprężanych, czyli bez związku ze zmianami szybkości wzrostu;

-brak jest zależności pomiędzy szybkością wzrostu indukowanego FC (w krótkotrwale preinkubowanych pasach) a częstością występowania orientacji poprzecznych;

-orientacja MTk w pasach inkubowanych przez więcej niż 12h jest w pewnym stopniu zależna od rodzaju roztworu inkubującego.

Niektóre wyniki jednakże wydają się być zgodne z hipotezą Schopfera:

-w epidermie *in situ* szybkość wzrostu wydłużeniowego i częstość występowania orientacji poprzecznych maleją bazypetalnie;

-bezpośrednio po wyizolowaniu pasa epidermy (co wiąże się jednocześnie z zahamowaniem wzrostu) orientacja MTk jest podłużna;

-zwiększenie szybkości wzrostu indukowanego FC powoduje zwiększenie częstości występowania orientacji poprzecznych i mniej skośnych wtedy, gdy w pasach nienaprężanych orientacja była bardziej stroma i podłużna.

Argumenty za i przeciw hipotezie Schopfera zostaną w następnej części „Dyskusji" omówione dokładniej. Najpierw jednak należy podkreślić, że określenie orientacja poprzeczna, podłużna w niniejszej pracy jest stosowane w wąskim znaczeniu

(patrz: Materiały i Metody, Rozdział 9), bowiem w wielu pracach, w których dokonywano analizy ilościowej MTk określenia: orientacja poprzeczna stosowano do zakresu kątowego 60^0-90^0, podłużnego do zakresu 0^0-30^0. Z punktu widzenia kierunku wzrostu precyzyjne rozróżnienie tych orientacji jest istotne, bowiem, jeżeli (zakładając, że MTk wyznaczają orientację MF) MF zorientowane poprzecznie i podłużnie względem długiej osi komórki ograniczają wzrost odpowiednio w kierunku poprzecznym i podłużnym, to wzrost w tych kierunkach przy orientacji skośnej nie jest ograniczony (Hejnowicz *et al.* 2006).

1.1 Orientacja mikrotubul kortykalnych w epidermie *in situ*

Orientacja MTk w epidermie hipokotyla słonecznika zależy od położenia wzdłuż hipokotyla. W komórkach młodych, leżących najbliżej węzła liścieniowego, które są zarazem najkrótsze i wydłużają się z największą szybkością, MTk są zorientowane poprzecznie i mniej stromo. W miarę oddalania się od węzła liścieniowego, komórki stają się dłuższe, szybkość ich wydłużania ulega zmniejszeniu. Towarzyszy temu zanik orientacji poprzecznych i wzrost częstości występowania orientacji bardziej stromych. Tendencja polegająca na przejściu od układów MTk poprzecznych poprzez skośne do podłużnych w związku ze wzrostem organu i procesami dojrzewania komórek jest opisana w łodygach (Laskowski 1990), korzeniach (Liang *et al.* 1996, Baskin *et al.* 1999, Granger i Cyr 2001), włóknach bawełny (Seagull 1985). Jednakże zależność pomiędzy orientacją MTk a szybkością wzrostu może być pozorna, na co wskazują dane z literatury. Indukowane różnymi czynnikami (światło niebieskie, unieruchomienie segmentu koleoptyla, stres wodny) zahamowanie wzrostu łodyg lub korzeni powoduje, co prawda zmiany w orientacji MTk, jednak są one niewspółmierne do zmniejszenia szybkości wzrostu (Laskowski 1990, Baskin *et al.* 1999, Himmelspach i Nick 2001) i sugeruje udział dodatkowych czynników w regulacji ułożenia MTk.

1.2 Orientacja mikrotubul kortykalnych w izolowanych pasach epidermy

Stan komórek w izolowanych pasach epidermy pod wieloma względami różni się od stanu komórek *in situ*. Wypływ różnych substancji (endogenne regulatory wzrostu) po oddzieleniu tkanki z organu, efekt zranienia (indukujący syntezę etylenu, kwasu jasmonowego), zmiana anizotropii naprężeń w ścianie komórkowej (zwiększenie podłużnego rozciągającego naprężenia podczas oddzielania tkanki z organu za pomocą pincety, trwały zanik naprężeń tkankowych), zahamowanie wzrostu - to wszystko są

potencjalne czynniki wpływające na układ MTk. Dlatego celowe było przeprowadzenie badań nad orientacją MT i jej ewentualną zmianą po izolacji pasów epidermy.

Układ MTk ulega reorientacji po izolacji epidermy z hipokotyla: orientacje poprzeczne i skośne zostają zastąpione orientacjami podłużnymi i bardziej stromymi, przy czym zmiany te najwcześniej pojawiają się w strefie I, najpóźniej w strefie III. Po upływie 2h od momentu izolacji układy MTk ulegają dalszej reorientacji, lecz o tendencji przeciwnej. W efekcie po 6h MTk przyjmują orientację albo poprzeczną albo skośną, przez co zostaje osiągnięty stan przypominający układ *in situ*, który w ciągu następnych 6h ulega tylko niewielkim zmianom, od 12-18h układ MTk nie zmienia się.

Przedstawione powyżej zmiany w układzie MTk po izolacji pasów epidermy można podzielić na dwa etapy: *(i)* pierwszy, trwający do 2h po izolacji, będący bezpośrednim wynikiem wyizolowania tkanki z organu, oraz następujący po nim *(ii)* etap drugi „adaptacyjny", w którym MTk dostosowały się do nowych, zmienionych z powodu izolacji tkanki, warunków.

Zmiany orientacji MTk w etapie pierwszym początkowo wiązano z działaniem dodatkowego naprężenia (σ) rozciągającego podczas oddzielania pasów epidermy z hipokotyli poprzez podważanie pincetką (patrz Materiały i Metody). Hejnowicz i współpracownicy (2000) na podstawie badań orientacji MTk w izolowanych pasach epidermy hipokotyla słonecznika wysunęli hipotezę, że MTk układają się w kierunku maksymalnego naprężenia (σ_{max}) rozciągającego w ścianie komórkowej. Epiderma *in situ* znajduje się w stanie podwyższonego podłużnego naprężenia (σ_{long}) rozciągającego z powodu istnienia naprężeń tkankowych (TS) w organie, jednak prawdopodobnym było, że przyłożenie dodatkowego naprężenia rozciągającego, wynikającego z metody pobierania tkanki, było sygnałem do reorientacji MTk i generowania układów podłużnych. Koncepcji tej przeczą wyniki dodatkowego eksperymentu, w którym pasy epidermy były wycinane za pomocą żyletki, tak aby zminimalizować wpływ czynnika mechanicznego; wówczas orientacja MTk po izolacji była bardzo podobna do tej, przy której zastosowano pincetę. Wyniki te wskazują więc na udział jakiegoś innego czynnika w reorientacji MTk bezpośrednio po izolacji.

Obserwowane zmiany MTk po izolacji wydawały się być zgodne z założeniami hipotezy Schopfera: wyizolowanie epidermy z hipokotyla powodowało by zahamowanie wzrostu, a to indukowało by podłużną orientację MTk.

Oddzielenie pasa epidermy z organu odcina pas od źródła endogennych regulatorów wzrostu, do których należy między innymi auksyna. W klasycznych eksperymentach, w których badano szybkość wzrostu, wykorzystywano izolowane pasy tkanki lub całe segmenty po uprzedniej inkubacji w różnych roztworach w celu usunięcia endogennej auksyny mogącej w trakcie eksperymentu dodatkowo wpływać na szybkość wzrostu. Badania własne (nie pokazane) wskazują, że warunki inkubacji pasów mające wpływ na usuwanie auksyny z pasów, mają zarazem wpływ na szybkość wzrostu naprężanych pasów: 70% naprężanych pasów inkubowanych przez 1h na bibule z niebuforowaną pożywką wydłużało się z niewielką szybkością (poniżej 0.5 % h^{-1}), podobną we wszystkich trzech strefach, jednakże w pozostałych pasach szybkość wzrostu w strefie III była wyraźnie większa niż w strefie I, II (ponad 1.5-3razy). Gdy jednak pasy inkubowano w szalce z niebuforowaną pożywką (tak, że mogły swobodnie „pływać" w roztworze) w żadnym z nich szybkość wzrostu w strefie III nie była większa niż w pozostałych strefach i ogólnie była mniejsza niż 0.3 % h^{-1}. Ten wynik jest pokazany na Ryc.32 jako próba kontrolna eksperymentu z FC po krótkim czasie preinkubacji pasów. Co mogło powodować szybszy wzrost w trzeciej strefie niektórych pasów inkubowanych na bibule z niebuforowanym roztworem? Najbardziej prawdopodobnym jest wyjaśnienie oparte na następujących założeniach: *(i)* auksyna potrzebna jest do obniżenia pH w ścianach komórkowych pasów epidermy; *(ii)* w izolowanych pasach brak jest źródeł auksyny, ale w momencie izolacji w komórkach znajduje się pewna ilość auksyny, która podlega w dalszym ciągu polarnemu transportowi; *(iii)* auksyna w polarnym transporcie przekracza na końcu komórki błonę komórkową i przedostaje się do apoplastu, gdzie dyfunduje. Gdy cząsteczki auksyny trafią na apikalny koniec następnej komórki są przez tę komórkę pobierane. Mogą być jednak uwalniane do roztworu inkubującego i tracone dla komórek. W przypadku inkubacji w szalce z roztworem, auksyna jest prawdopodobnie szybciej uwalniana do roztworu niż przy inkubacji na bibule. W pierwszym przypadku pas na całej długości pozbawiany jest auksyny, w drugim (przy inkubacji na bibule) - może wystąpić sytuacja, w której okresowo najwięcej auksyny jest w strefie trzeciej i strefa ta rośnie najszybciej, gdy pas jest naprężany. Po pewnym czasie auksyny ubywa i z tej strefy.

Mayumi i Schibaoka (1996), pokazali, że pozbawienie segmentu epikotyla fasoli endogennej auksyny spowodowało znaczne zwiększenie częstości występowania układów podłużnych MTk. Wiadomo również, że auksyna zwiększa częstość

występowania układów poprzecznych, przy czym dotyczy to zarówno rosnących koleoptyli, epikotyli (Nick *et al.* 1990, Zandomeni i Schopfer 1993, 1994, Fischer i Schopfer 1997, Takesue i Shibaoka 1998) jak również, i co warto podkreślić, nierosnących segmentów epikotyli (Takesue i Shibaoka 1999). To ostatnie stwierdzenie wskazuje, że auksyna *per se* wpływa na orientację MTk bez konieczności zmiany szybkości wzrostu. Nic więc dziwnego, ze w izolowanych pasach reorientacja najszybciej przebiega w strefie I. Po upływie 0.5h od momentu izolacji, w strefie III w 40% badanych pasów epidermy rozkład częstości występowania orientacji MTk jest stale podobny do tego występującego *in situ*, czyli histogramy są typu Bz. W kontekście badań Takesue i Shibaoka (1999) można więc przypuszczać, że to lokalna akumulacja auksyny (w następstwie polarnego transportu z bardziej apikalnej części) w strefie III opóźnia zmianę orientacji MTk po izolacji. Reorientacja MTk w innych strefach wynikała by z braku auksyny w tych strefach, a nie z zahamowania wzrostu.

W ten sposób można byłoby wytłumaczyć rozbieżności pomiędzy wynikami otrzymanymi w niniejszej pracy (MTk podłużne lub strome w 0.5-2h po wyizolowaniu) a badaniami Hejnowicza i współpracowników (2000), w których pokazano, że w pasach epidermy inkubowanych przez 1.5h na agarze z niebuforowaną pożywką układ MTk był mniej stromy, z maksimum przy 60^0. Układ MTk był wyznaczany w miejscu odpowiadającym mniej więcej strefie III. Rozbieżności można uzasadnić następująco: mniej stroma orientacja MTk w pasach nienapreżanych mogła wynikać z lokalnego nagromadzenia endogennej auksyny, bowiem inkubacja pasów na agarze, mogła opóźnić jej wypływ z tkanki.

W etapie drugim „adaptacyjnym" tj. po upływie 2h, MTk ulegają dalszej stopniowej reorientacji, z tym, że kierunek tych zmian jest przeciwny w stosunku do zmian w etapie pierwszym, co w efekcie daje układ zbliżony do tego *in situ* i co należy podkreślić, orientacja MTk nadal zależy od strefy pasa. Jest mało prawdopodobne, że i w tym przypadku za reorientację odpowiada auksyna, bowiem prawdopodobnie nie jest syntetyzowana w izolowanych pasach .

1.3. Wpływ szybkości wzrostu indukowanego przez naprężenie i niskie pH buforu na orientację mikrotubul kortykalnych w pasach inkubowanych przez 12-14h

Izolowane pasy epidermy inkubowane przez 12-14h w buforowanej pożywce wydłużają się pod warunkiem, że: *(i)* ściana charakteryzuje się określoną podatnością (φ), *(ii)* istnieje odpowiednie naprężenie rozciągające wystarczające do przekroczenia progu

płynięcia. Pierwszy warunek jest spełniony przy inkubacji pasów w buforowanej pożywce o pH 4.5, wiadomo bowiem, że obniżenie pH powoduje zwiększenie podatności ścian komórkowych *in vitro* (Cleland *et al.* 1987) oraz *in situ* (Tanimoto *et al.* 2000). Biorąc pod uwagę wiskoelastyczne (lepkoelastyczne) właściwości ścian, ich podatność należy uzależniać od modułu elastyczności oraz współczynnika lepkości, przy czym wiadomo, że ten ostatni parametr ulega obniżeniu przy niskim pH (Tanimoto *et al.* 2000).

Przyłożenie do pasów odpowiednio dużego naprężenia rozciągającego zapewnia spełnienie warunku drugiego, bowiem naprężenie w ścianach pasa izolowanego wynikające bezpośrednio z turgoru, jest niewystarczające do przekroczenia progu płynięcia (Hejnowicz i Sievers 1996b).

Wzdłuż pasów wydłużających się pod wpływem obniżonego pH pożywki i naprężenia istnieje gradient wrażliwości na pH: najszybciej wydłuża się strefa I, gdzie komórki są najmłodsze i najkrótsze w porównaniu do stref leżących poniżej (II, III). Podobny gradient stwierdzono również w badaniach wzrostu korzenia, indukowanego przez obniżenie pH roztworu inkubującego: największe przyspieszenie wzrostu obserwowano w apikalnej części strefy wydłużania korzenia (Winch i Pritchard 1999). Stwierdzono również, że przyspieszenie wzrostu indukowanego przez niskie pH było procesem przejściowym, w czasie od 60 do 90min. szybkość wzrostu ulegała obniżeniu. W badaniach zaprezentowanych w niniejszej pracy wydłużanie pasów było badane do 60min. od momentu przyłożenia naprężenia, nie wiadomo więc czy i w tym przypadku szybkość wzrostu nie uległaby zahamowaniu. Przyczyną różnic w szybkości wzrostu pomiędzy strefami mogą być różnice w składzie biochemicznym ich ścian, jak i również w teksturze związanej z orientacją MF, w strefie I (wnioskując z orientacji MT) można stwierdzić, że w ścianie przeważają MF poprzeczne, zaś w strefach leżących poniżej - MF skośne.

Zgodnie z hipotezą Schopfera zmiany szybkości wydłużania powinny znaleźć swoje odzwierciedlenie w orientacji MTk: poprzeczne i mniej strome orientacje powinny występować w rosnących pasach, podłużne i bardziej strome w nierosnących. Przewidywanie to nie jest spełnione mimo istotnych różnic w szybkości wzrostu, bowiem pomiędzy pasami naprężanymi i nienaprężanymi przy pH 4.5, czyli rosnącymi i nie rosnącymi, nie obserwowano znaczących zmian w orientacji MTk. Odnotowane różnice w typie histogramów w pasach w porównaniu do epidermy *in situ* występują z niewiele większą częstością w pasach naprężanych niż kontrolnych (nienaprężonych),

co więcej, różnice te nie mają określonego charakteru: część przypadków jest związana ze zwiększeniem częstości występowania orientacji poprzecznych i mniej stromych, część znów - podłużnych i bardziej stromych.

Wiadomo, że w pewnych warunkach MTk i ich układy mogą być dodatkowo stabilizowane, wskutek czego MTk mają zwiększony próg wrażliwości na czynniki takie jak obniżona temperatura; prawdopodobnie wskutek połączenia z stabilizującym białkiem cytozolowym lub ze ścianą komórkową poprzez białka transmembranowe (Shibaoka 1994). W badaniach przedstawionych powyżej rozważano również wystąpienie takiej stabilizacji, która hamowałaby reakcję MTk na naprężenie (i jego skutki odkształcenie elastyczne i plastyczne), zaobserwowano bowiem, że wiązki MTk w pasach inkubowanych przez dłuższy czas są grubsze niż te występujące *in situ.* Aby sprawdzić, czy MTk w takich pasach są jeszcze zdolne do reorientacji zastosowano dodatkowy czynnik - światło białe, który jak wiadomo powoduje zmianę orientacji na podłużną (Iwata i Hogetsu 1989, Ueda i Matsuyama 2000). Po zastosowaniu światła o natężeniu (18W m^{-2}) nie obserwowano globalnej przebudowy układu MTk, większość komórek posiadała układy wzajemnie równoległych wiązek MTk o orientacji poprzecznej i skośnej, natomiast obserwowano również komórki z nierównoległymi MTk, w których pojedyncze wiązki były nachylone podłużnie względem długiej osi komórki, tylko w pojedynczych komórkach cały układ można było zakwalifikować do podłużnych. Zwiększenie natężenia światła białego (do 24W m^{-2}) spowodowało globalną reorganizację układu MTk widoczną w większości komórek. Wniosek jest jasny; MTk w badanych pasach są zdolne do reorientacji. Warto jednak zauważyć, że światło jest bardzo silnym czynnikiem z punktu widzenia reorientacji MTk. W hipokotylu *Arabidopsis* reorientację z układu poprzecznego do podłużnego w obserwowano już przy świetle pokojowym (Ueda i Matsuyama 2000) lub przy natężeniu 6W m^{-2} (Iwata i Hogetsu 1989).

Reorientacja MTk w izolowanych pasach po naświetlaniu jest dodatkowym argumentem falsyfikującym hipotezę Schopfera, bowiem nie jest związana ze zmianami w szybkości wzrostu. Po auksynie, światło białe jest kolejnym czynnikiem zmieniającym orientację MTk bez udziału wzrostu.

1.4 Wpływ szybkości wzrostu indukowanego przez naprężenie i fuzikokcynę na orientację mikrotubul kortykalnych w pasach inkubowanych przez 1h

Fuzikokcyna powoduje zwiększenie szybkości wzrostu, ale tylko w pasach ze skróconym czasem preinkubacji; w pasach preinkubowanych przez 12-14h nie stwierdzono przyspieszenia wzrostu. Należy podkreślić, że w przeciwieństwie do buforowanego roztworu o niskim pH, FC powoduje rozluźnienie ściany pośrednio, poprzez aktywację pomp protonowych, które zwiększają wypływ jonów H^+ z komórki do apoplastu (Hager *et al.* 1991). Jest prawdopodobne, że dłuższy czas preinkubacji w niebuforowanej pożywce powoduje unieczynnienie pomp, lub wręcz ich zanik. Biorąc pod uwagę fakt, że auksyna jest czynnikiem potrzebnym dla transkrypcji genów H^+-ATPazy, można przypuszczać, że to właśnie brak auksyny w pasach preinkubowanych przez 12-14h powoduje brak pomp protonowych i wskutek tego FC nie może przejawiać swego wpływu.

Fuzikokcyna już w pasach nienaprężanych inkubowanych przez 1h powoduje wyraźne zwiększenie częstości występowania orientacji poprzecznych i mniej stromych w strefie I i II w porównaniu z kontrolą (choć ten wpływ nie jest jednakowy w różnych pasach), z czego wynika, że FC, obok auksyny i światła białego należy do czynników, które wpływają na MTk niezależnie od szybkości wzrostu.

Zwiększenie szybkości wzrostu poprzez przyłożenie naprężenia rozciągającego w obecności FC powoduje reorientację MTk w kierunku układu poprzecznego, gdy w pasach nienaprężanych orientacja MTk była podłużna i skośna. Reorientacja ta dotyczy głównie strefy I i II, pomimo faktu, że szybkość wzrostu jest podobna we wszystkich trzech strefach. Stanowi to kolejny argument dający podstawy do falsyfikacji hipotezy Schopfera.

Wykazano, że przynajmniej w przypadku orientacji poprzecznych brak jest korelacji pomiędzy częstością występowania tych orientacji a szybkością wzrostu indukowaną FC i naprężeniem. Jednakże można stwierdzić, że MTk poprzeczne najczęściej występują w strefie I, najrzadziej zaś w strefie III. Wydaje się więc, że położenie komórki wynikające z jej wieku (a wiążące się z jej kształtem, strukturą ściany komórkowej) ma istotny wpływ na organizację MTk. Na uwagę zasługuje również fakt, że w niektórych pasach naprężanych w niebuforowanej pożywce, w strefie I nastąpiło zwiększenie częstości występowania orientacji poprzecznych i mniej stromych, zaś w pozostałych strefach – podłużnych przy zaledwie ułamkowej szybkości wzrostu (poniżej 0.3% h^{-1}). Trudno jednoznacznie stwierdzić czy te zmiany

mają znaczenie, ponieważ dotyczą one zaledwie paru przypadków, jednakże charakter tej reorientacji jest zachowany w obrębie strefy i jest widoczny również na histogramach zbiorczych.

Przedstawione dane wskazują na to, że choć zwiększenie szybkości wzrostu w pewnych warunkach może prowadzić do zwiększenia częstości występowania układów poprzecznych i mniej skośnych, to nie jest to warunek konieczny do wystąpienia tych układów. Nie istnieje prosty związek pomiędzy orientacją MTk a szybkością wzrostu. Szereg dodatkowych czynników takich jak endogenna auksyna, FC, światło białe wpływają na MTk bez udziału wzrostu.

2. WPŁYW NAPRĘŻENIA NA ORIENTACJĘ MIKROTUBUL KORTYKALNYCH

Jak pokazano w poprzednim rozdziale szybkość wzrostu (odkształcenia plastycznego) nie jest decydującym czynnikiem w regulacji orientacji MTk. Wskazują na to również przykłady różnej orientacji MTk w komórkach nierosnących (Williamson 1990, 1991, Wymer *et al.* 1996, Kropf *et al.* 1997, Takesue i Shibaoka 1999, Fisher i Cyr 2000). Źródłem informacji kierunkowej dla orientacji MTk może być naprężenie, które, co jest istotne dla morfogenezy, zależy od geometrii komórki. W komórkach zwierzęcych orientacja MT budujących wrzeciono mitotyczne zależna jest od kształtu komórki: w komórkach wydłużonych wrzeciono jest ułożone równolegle do długiej osi, a gdy za pomocą mikromanipulacji ułożenie takie jest zmieniane, wrzeciono rotuje aż do uzyskania właściwej orientacji względem osi komórki (O'Connel i Wang 2000).

U roślin naprężenie jest przenoszone przez ściany komórkowe, pozwalając na integrację informacji z całej tkanki czy nawet organu. Naprężenie wielokrotnie było wskazywane jako czynnik wpływający na MTk (Williamson 1990, 1991, Hush i Overall 1991, Fisher i Cyr 2000, Hejnowicz *et al.* 2000) lub na MT uczestniczące w podziale (Lynch i Lintilhac 1997). Naprężenie, jak również wynikające z niego odkształcenie, są wielkościami tensorowymi. Przyjmują wartości ekstremalne w trzech wzajemnie ortogonalnych kierunkach, tj. kierunkach głównych (PDs, z ang. Principal Directions). Układ PDs naprężenia (PDσ), w ścianie naprężonej turgorowo, zależy od kształtu komórki. Odkształcenie ściany komórkowej w danym kierunku uzależnione jest od naprężenia ściany w tym kierunku oraz od jej właściwości mechanicznych, zależnych często od kierunku, między innymi ze względu na orientację MF. Mikrotubule połączone białkami transbłonowymi ze ścianą, mogłyby funkcjonować jako „czujniki"

odkształcenia w ścianie i zgodnie z jego PDs (PDε) ukierunkowywać wzrost i podziały komórki. Hejnowicz (*et al.* 2000) wysunął hipotezę, że zmiana anizotropii naprężenia w ścianie jest czynnikiem reorientującym MTk w kierunku maksymalnego naprężenia w ścianie, zwracając przy tym uwagę, że szybkość wzrostu może wprowadzać dodatkowe modyfikacje orientacji MTk

Gertel i Green (1977) uważają, że naprężenie może być rozpoznawane i mierzone tylko wielkością odkształceń (ε), jakie powoduje w danym materiale. Mogą to być odkształcenia elastyczne (odwracalne, ε_{el}), występujące zarówno w komórkach nierosnących jak i rosnących, lub odkształcenia plastyczne (nieodwracalne, ε_{pl}), występujące w komórkach rosnących.

2.1. Anizotropia naprężenia, odkształcenia elastycznego oraz orientacja mikrotubul kortykalnych w nienaprężanych pasach epidermy

Jak już w poprzednim rozdziale zasygnalizowano, MTk w izolowanych, nienaprężanych pasach epidermy mogą organizować się bez udziału wzrostu. Reorientacja MTk bezpośrednio po wyizolowaniu (do 2h) jest prawdopodobnie związana z wypływem auksyny. Po tym etapie, następuje kolejny etap (adaptacyjny), podczas którego MTk orientują się według jakiegoś nowego schematu, w efekcie którego po 6h od momentu izolacji orientacja MTk przypomina orientację *in situ* (poprzeczne i mniej strome w strefie I, mniej i bardziej strome w strefach pozostałych). Rozważmy udział naprężenia w orientacji MTk, którego „miarą" jest odkształcenie elastyczne (ε_{el}). Najpierw rozważony będzie rozkład PDs dla naprężenia i wynikającego z niego odkształcenia elastycznego w komórce izolowanej.

W komórce sferycznej występuje izotropia naprężeń, naprężenie w każdym kierunku jest takie samo. W komórce cylindrycznej występuje anizotropia naprężeń; naprężenie w kierunku podłużnym (σ_{long}) jest takie jak w komórce izodiametrycznej o takiej samej średnicy jak średnica cylindra, zaś naprężenie w kierunku poprzecznym (σ_{trans}) jest prawie dwukrotnie większe ($\sigma_{trans} \approx 2\ \sigma_{long}$).

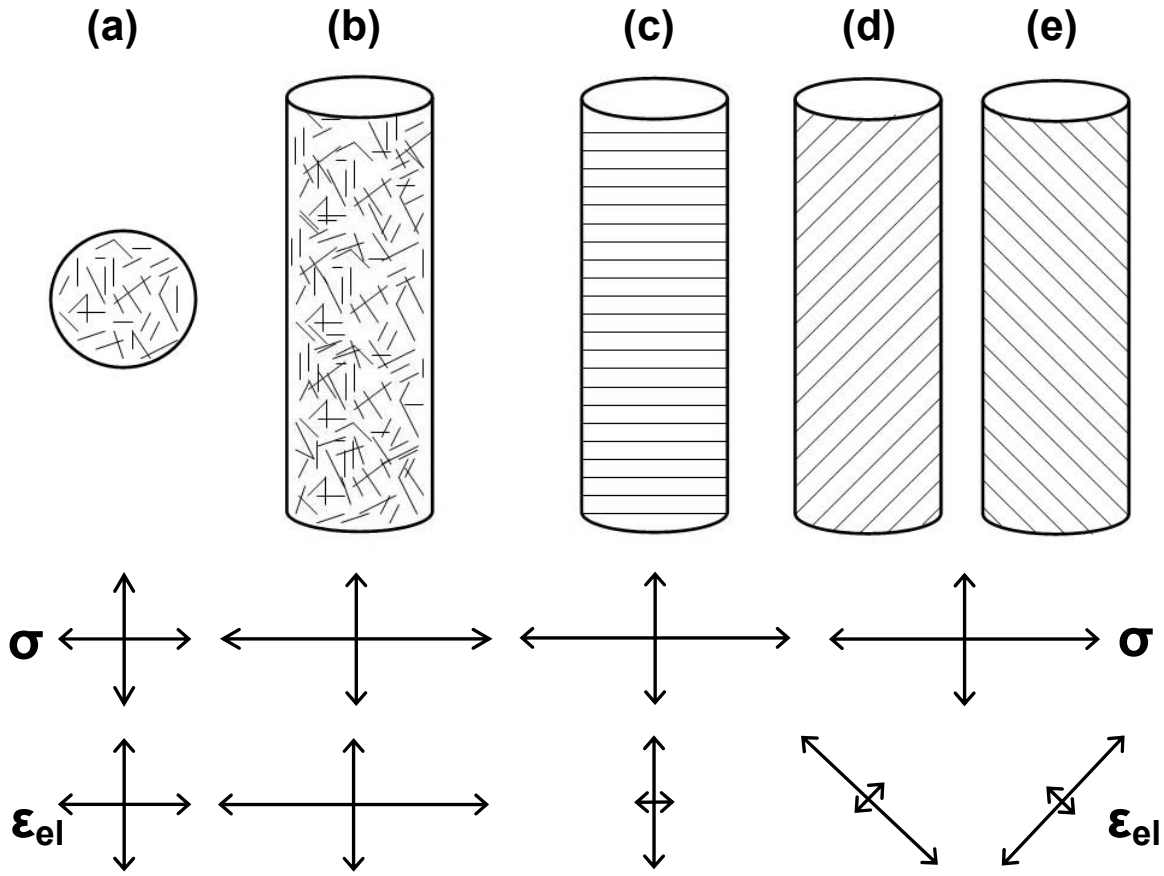
W badanych pasach epidermy, wszystkie komórki miały kształt w przybliżeniu cylindryczny (nawet w strefie I długość była przynajmniej 4 razy większa niż szerokość). W związku z tym, że anizotropia naprężenia była podobna we wszystkich strefach: PDσ_{max} w kierunku poprzecznym, PDσ_{min} w kierunku podłużnym, a pomimo tego orientacja MTk w nienaprężanych pasach zmieniała się w zależności od strefy, postanowiono rozważyć odkształcenie elastyczne (ε_{el}) w ścianie, które może być różne

w różnych strefach, jeśli tylko orientacja MF ściany zostanie wzięta pod uwagę. Mikrofibryle celulozowe z powodu swojej dużej wytrzymałości na rozciąganie (duży moduł elastyczności [Vincent 1999, Chanliaud *et al.* 2002]) powodują, że odkształcenie w kierunku równoległym do MF jest mniejsze niż w kierunku prostopadłym.

W epidermie ściana jest wielowarstwowa typu helikoidalnego. Z badań Hejnowicza i Borowskiej-Wykręt (2005) wynika, że podłużne naprężenie rozciągające jest przenoszone również przez zewnętrzne warstwy ściany, wbrew rozpowszechnionemu poglądowi, że w przenoszeniu naprężeń główną rolę odgrywa warstwa wewnętrzna (Richmond 1983). Odkształcenie elastyczne ściany będzie więc uzależnione od wypadkowego ułożenia MF we wszystkich warstwach ściany, czyli jej tekstury (Baskin 2005, Hejnowicz *et al.* 2006). Ułożenie MF w ścianie zależy między innymi od układu MTk (które wpływają na odkładanie się MF w warstwie wewnętrznej ściany), oraz od wieku komórki: wiadomo bowiem, że MF ulegają biernej reorientacji (w warstwach zewnętrznych) pod wpływem rozciągania towarzyszącemu wzrostowi (Wolters-Arts i Sassen 1991). Oczywiste jest, że na odkształcenie ściany nie wpływa jedynie orientacja MF ale również obecność innych składników (pektyny, ksyloglukany), które rzutują na jej parametry mechaniczne (Chanliaud *et al.* 2002). Jednak w celu uproszczenia przedstawionych tutaj rozważań wzięto pod uwagę jedynie ułożenie MF.

Rozważmy zależność pomiędzy anizotropią naprężenia (σ) i odkształcenia elastycznego (ε_{el}) ściany komórkowej z uwzględnieniem jej tekstury w izolowanej komórce przy założeniu: odkształcenie jest minimalne w kierunku wypadkowej orientacji MF. Istnieje zależność pomiędzy głównymi kierunkami naprężenia i odkształcenia, jednak odkształcenie ściany w pewnym stopniu jest warunkowane jej teksturą **(Ryc.37)**. Teoretycznie, w izolowanej, turgorowo naprężonej komórce izodiametrycznej ze ścianami o strukturze izotropowej (gdy MF są ułożone chaotycznie), istnieje izotropia zarówno naprężenia jak i odkształcenia, żaden z kierunków nie jest wyróżniony **(Ryc.37a)**. W komórce cylindrycznej ze ścianami o strukturze izotropowej **(Ryc.37b)** główne kierunki naprężenia ($PD\sigma$) i odkształcenia ($PD\varepsilon_{el}$) pokrywają się ze sobą ($PD\sigma = PD\varepsilon_{el}$), przy czym kierunek, w którym naprężenie jest maksymalne, jest jednocześnie kierunkiem maksymalnego odkształcenia ($PD\sigma_{max} = PD\varepsilon_{el\ max}$; $PD\sigma_{min} = PD\varepsilon_{el\ min}$). Gdy ściany rozważanej komórki będą anizotropowe, z MF ułożonymi poprzecznie względem długiej osi komórki **(Ryc.37c)**, to wtedy kierunek maksymalnego naprężenia (poprzeczny do długiej osi komórki) odpowiada

kierunkowi, w którym odkształcenie jest najmniejsze ($PD\sigma=PD\varepsilon_{el}$, przy czym $PD\sigma_{max}=PD\varepsilon_{el\ min}$, $PD\sigma_{min}=PD\varepsilon_{el\ max}$). Gdy ściany rozważanej komórki będą anizotropowe, z MF ułożonymi skośnie względem długiej osi komórki **(Ryc.37d,e)**, główne kierunki naprężenia i odkształcenia nie pokrywają się ($PD\sigma\neq PD\varepsilon_{el}$), są one bowiem nachylone względem siebie pod określonym kątem zależnym od „skośności" układu MF. Należy zaznaczyć, że przedstawione schematy przedstawiają jedynie kierunki główne bez brania pod uwagę szczegółów wartości naprężenia i odkształcenia.



Ryc.37. Anizotropia naprężenia (σ) i odkształcenia elastycznego (ε_{el}) w komórce sferycznej (ze ścianami o własnościach izotropowych), komórkach cylindrycznych (ze ścianami o własnościach izotropowych oraz anizotropowych).

W przypadku pasów epidermy słonecznika, można założyć, że wypadkowa orientacja MF w ścianach po upływie 6h od izolacji jest podobna do tej *in situ*, bowiem czas (< 4h), w którym MT były zorientowane podłużnie, był zbyt krótki aby zmienić globalną strukturę ściany. Dlatego z przybliżeniu można określić wypadkową orientację MF w ścianach pasów epidermy następująco: w strefie I - poprzeczna, w strefie II- skośna typu S i Z (w równych proporcjach), w strefie III – skośna typu Z oraz kierunek, w którym odkształcenie elastyczne jest maksymalne: w strefie I – kierunek podłużny,

w strefie II- kierunek skośny Z i S (odpowiednio do orientacji MF), w strefie III - kierunek skośny S.

Po 6h od momentu izolacji orientacja MTk w nienaprężanych pasach inkubowanych w pożywce niebuforowanej, przypomina orientację *in situ*. To co nieznacznie różni orientację MTk w izolowanych pasach od tej *in situ,* to mniejsza częstość występowania orientacji poprzecznych i wyraźna dominacja układów skośnych S w strefie III. Być może, to warstwy z podłużnymi MF, powstałe bezpośrednio po izolacji powodują zmniejszenie częstości występowania orientacji poprzecznych MTk, poprzez niewielką modyfikację $PD\varepsilon_{el.}$

W strefie I MTk są poprzeczne i mniej strome, co jest zgodne z kierunkiem, w którym $PD\varepsilon_{el}$ jest minimalny (**Ryc.37c**). Zmniejszenie częstości występowania orientacji poprzecznych MTk w porównaniu z *in situ*, może być związane z frakcją podłużnych MF powstałymi bezpośrednio po izolacji (z powodu podłużnych MTk) i w efekcie niewielkiego obrócenia $PD\varepsilon_{el\ min}$. W strefie II MTk są skośne S i Z, czyli orientują się względem albo $PD\varepsilon_{el\ max}$ albo $PD\varepsilon_{el\ min}$ **(Ryc.37d,e)**, ze względu na podobną częstość występowania układów Z i S trudno jednoznacznie określić ten kierunek. W strefie III MTk po 6h inkubacji (orientacje skośne S i Z) są zorientowane zgodnie z $PD\varepsilon_{el\ max}$ lub $PD\varepsilon_{el\ min}$, natomiast po 12h (orientacje MTk skośne S) zgodnie z $PD\varepsilon_{el\ max.}$ **(Ryc.37d)**.

Wynika z tego, że dopiero po dłuższym czasie (>12h) pojawia się określona tendencja do orientacji MTk, przy czym wybór kierunku zależy od danej strefy: $PD\varepsilon_{el\ min}$ w strefie I, $PD\varepsilon_{el\ max}$ w strefie III. Zastanawiające jest to, że rodzaj roztworu inkubującego (buforowana i niebuforowana pożywka) może zmienić wybór kierunku według którego, MT się orientują: w strefie III, po 12-14h inkubacji w buforowanej pożywce MTk są zorientowane zgodnie z $PD\varepsilon_{el\ max}$ lub $PD\varepsilon_{el\ min}$ (występują zarówno orientacje skośne MTk S jak i Z). Być może jakieś dodatkowe czynniki (jony wchodzące w skład buforu MES i fosforanowego lub ciśnienie osmotyczne, które różni te roztwory) regulują ten wybór.

Podsumowując, w przypadku pasów nierosnących, gdzie „miarą" naprężenia może być odkształcenie elastyczne orientacja MT jest zgodna z $PD\varepsilon_{el\ min}$ albo $PD\varepsilon_{el\ max}$, przy czym dostosowanie się MTk do tych kierunków (gdy wcześniej MTk zmieniły swą orientację pod wpływem innego czynnika) wymaga dłuższego czasu.

2.2. Anizotropia naprężenia, odkształcenia elastycznego oraz orientacja mikrotubul kortykalnych w naprężanych pasach epidermy

Odpowiednio duże naprężenie rozciągające przyłożone do izolowanych pasów (F=0.05 i 0.08N na 1mm szerokości pasa) powinno odwrócić anizotropię naprężenia wynikającą bezpośrednio z turgoru (σ_{turg}), tak, że $PD\sigma_{max}$ będzie w kierunku podłużnym. Siła 0.05N na 1mm szerokości jest większa lub równa sile działającej w kierunku podłużnym na epidermę *in situ* a wynikającą z TS (naprężeń tkankowych). Siłę wynikającą z TS szacuje się na 0.05N na 1mm (Hejnowicz i Sievers 1995b) lub 0.02N na 1mm (Hejnowicz *et al.* 2000). W związku z tym, że przynajmniej w przypadku zastosowania większej siły (0.08N) przewaga $PD\sigma_{max}$ nad $PD\sigma_{min}$ jest duża, można się spodziewać przesunięcia $PD\varepsilon_{el\ max}$ w kierunku podłużnym (pomimo skośnej orientacji MF).

Przyłożenie naprężenia rozciągającego do pasów, w zależności od dodatkowych czynników (pH, FC) może zwiększać nie tylko szybkość wzrostu wydłużeniowego pasów ale również odkształcenie elastyczne lub wiskoelastyczne (Richmond *et al.* 1980, Hohl i Schopfer 1992, Nolte i Schopfer 1997). Jednakże w pasach inkubowanych przez 12-14h w buforowanej pożywce nie stwierdzono znaczących zmian orientacji MTk po 1h naprężania. Co więcej, naprężanie pasów inkubowanych tylko przez 1h w niebuforowanej pożywce również nie spowodowało globalnej reorientacji (choć w niektórych przypadkach pewne tendencje są zauważalne, patrz niżej).

Dane z literatury wskazują na to, że reorientacja MTk następuje po długotrwałym działaniu naprężenia. Lynch i Lintilhac (1997) ukierunkowane płaszczyzny podziału protoplastów, obserwowali dopiero po 2-5dniowym naprężaniu, po 12h naprężaniu płaszczyzny podziałów były zorientowane przypadkowo. W naciętym poprzecznie korzeniu reorientacja MT z układu poprzecznego względem długiej osi organu do podłużnego była widoczna po 5h (Hush *et al.* 1990) lub po 12-24h od momentu nacięcia (Geitmann *et al.* 1997), przy czym tą zmianę orientacji interpretowano jako wynik zmian głównych kierunków naprężenia po nacięciu, nie związanego ze wzrostem (Hush *et al.* 1990). Wyniki w niniejszej pracy (patrz rozdział poprzedni) również wskazują na to, że reorientacja MTk według $PD\varepsilon_{el}$ wymaga dłuższego czasu. Być może krótkotrwałe zmiany anizotropii naprężenia nie mają dla rośliny aż takiego znaczenia (jak na przykład zmienne podmuchy wiatru), aby uruchamiać cały aparat związany z reorientacją MTk. Może dopiero długotrwały wpływ naprężenia/odkształcenia jest „odczuwany" przez MTk. Oczywiste jest, że zmiana układu MTk nie jest jedynym sposobem „odpowiedzi" na zmianę naprężenia, przy

krótkotrwałej zmianie anizotropii naprężeń rośliny mogą reagować w inny sposób niż reorientacją MTk, na przykład regulacją ciśnienia osmotycznego.

W tym kontekście zastanawiający jest efekt 1h naprężania w obecności FC, które spowodowało, przynajmniej w strefie I i II, zwiększenie częstości występowania orientacji poprzecznych i mniej stromych w porównaniu do pasów nienaprężanych. Być może efekt ten jest wynikiem kumulacji wpływu samej FC i naprężenia. Nie jest znany mechanizm wpływu FC na MTk, możliwe jednak, że odbywa on się poprzez zmianę właściwości ściany komórkowej. Fuzikokcyna indukując wypływ protonów z komórki do apoplastu, powoduje jego zakwaszenie, co w następstwie poprzez aktywację ekspansyn lub innych białek prowadzi do rozluźnienia struktury ściany. Ta zmiana właściwości mechanicznych może rzutować na anizotropię odkształcenia (ε_{el}) w pasach nienaprężanych, czego wynikiem może być reorientacja MTk (choć nie we wszystkich pasach). Przyłożenie dużego naprężenia rozciągającego do pasów z rozluźnioną ściana komórkową powoduje odkształcenie maksymalne w kierunku działania siły ($PD\varepsilon_{el\ max}$ w kierunku podłużnym z dużą przewagą w stosunku do $PD\varepsilon_{el\ min}$). I tak, w pasach naprężanych w obecności FC w strefie I układ MTk zgodny jest z $PD\varepsilon_{el\ min}$; w strefie II taka tendencja jest również widoczna, choć z mniejszym skutkiem. W strefie III naprężanie powoduje jedynie minimalne zmiany w orientacji MT. Interpretacja ułożenia MTk po 1h preinkubacji jest jednak trudna z tego względu, że jak pokazano wcześniej, MTk są w trakcie reorientacji spowodowanej izolacją epidermy z organu.

Wcześniej zaznaczono, że naprężenie pasów siłą 0.08N w niebuforowanej pożywce (po 1h inkubacji) przynajmniej w niektórych przypadkach miało wpływ na MTk (Ryc. 35a,a'): zwiększyła się częstość występowania orientacji poprzecznych w strefie I, zaś w pozostałych strefach – orientacji podłużnych. Biorąc pod uwagę główne kierunki odkształcenia w pasach naprężanych ($PD\varepsilon_{el\ max}$ w kierunku podłużnym) można stwierdzić, że w strefie I MTk istnieje tendencja do orientacji według $PD\sigma_{min}$, w strefie II i III według $PD\varepsilon_{max}$. Należy zaznaczyć, że według tych samych kierunków orientowały się MTk w pasach inkubowanych w niebuforowanej pożywce po 12h od momentu izolacji (patrz rozdział poprzedni). Podobne wyniki uzyskali w swych eksperymentach Lynch i Lintilhac (1997): płaszczyzny podziału protoplastów w żelu agarozowym, który był następnie naprężany były równoległe do maksymalnych lub minimalnych PDs naprężenia/odkształcenia w żelu. W protoplastach, również zatapianych w agarozie, następnie naprężanej, układ MTk był prostopadły do wektora siły rozciągającej (Fisher i Cyr 2000).

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki są częściowo zgodne z wynikami Hejnowicza i współpracowników (2000): w naprężanych pasach (pochodzących z obszaru hipokotyla odpowiadającemu strefie III) MTk układają się zgodnie z kierunkiem $PD\sigma_{max}$ (który w tym przypadku jest taki sam jak $PD\varepsilon_{max}$). Pewne rozbieżności dotyczą orientacji w pasach nienaprężanych, gdzie MT były mniej strome (Hejnowicz *et al.* 2000) – co być może jest efektem czasowej akumulacji endogennej auksyny. W niniejszej pracy pokazano, że MTk już w pasach nienaprężanych, inkubowanych na niebuforowanej pożywce (przez 1-2h, Ryc.20. III c, d) są podłużne i bardziej strome, w związku z czym, efekt naprężania (podłużne MTk) w pracy Hejnowicza był wyraźniejszy poprzez porównanie go do sytuacji w pasach nienaprężanch. Częściowo mniejsza wyrazistość efektu naprężania w niniejszej pracy może wynikać z szybszego wypływu auksyny z izolowanych pasów.

2.3. Anizotropia naprężenia, odkształcenia oraz orientacja mikrotubul kortykalnych w epidermie *in situ*

W epidermie *in situ* hipokotyla naprężenie rozciągające jest większe w kierunku podłużnym niż poprzecznym prawie 3-krotnie, z powodu dużego rozciągającego TS_{long}. Wiadomo również, z badań przedstawionych w niniejszej pracy jak i danych z literatury, że szybkość wzrostu wydłużeniowego maleje bazypetalnie; dodatkowo występuje również wzrost w kierunku obwodowym. Jednakże tym odkształceniom nieodwracalnym towarzyszą również odkształcenia odwracalne (elastyczne), które nie są dostatecznie uwzględniane w badaniach, głównie z powodu trudności w ich eksperymentalnym wyznaczaniu (Proseus *et al.* 1999, Peters *et al.* 2001). Okazuje się, że w hipokotylu słonecznika istnieje gradient podłużnego odkształcenia elastycznego (ε_{el}): jest ono największe w obszarach rosnących i maleje bazypetalnie (Peters *et al.* 2001). Co więcej, gradient odkształcenia elastycznego , choć nieco mniejszy, istnieje również w hipokotylach nie wydłużających się, co sugeruje, że odkształcenie to, nie jest ściśle skorelowane z szybkością wzrostu, zależy jednak od właściwości mechanicznych (między innymi tekstury) ścian komórkowych.

Zgodnie z wcześniej przyjętymi założeniami można rozważyć anizotropię odkształcenia w epidermie *in situ*. W strefie I $PD\varepsilon_{el\ max}$ jest w kierunku podłużnym, z powodu dużego rozciągającego naprężenia podłużnego oraz poprzecznego ułożenia MF (wnioskowanego na podstawie orientacji MTk). W strefie II w większości komórek MF są zorientowane skośnie, więc i przypuszczalnie $PD\varepsilon_{el}$ są obrócone pod pewnym

kątem względem głównych kierunków naprężenia: $PD\varepsilon_{el\ max}$ jest skośne typu S (w komórkach z MF skośnymi typu Z) i skośne typu Z (w komórkach z MF skośnymi typu S). W strefie III, w większości przypadków MF są skośne typu Z, stąd $PD\varepsilon_{el\ max}$ jest skośny typu S. Wiadomo, że w strefie bazalnej leżącej u podstawy hipokotyla układ MTk (więc i przypuszczanie MF) jest podłużny (Hejnowicz *et al.* 2006) a podłużne odkształcenie jest bliskie zeru (Peters *et al.* 2001). W tym przypadku $PD\varepsilon_{el\ max}$ może być w kierunku poprzecznym.

W podsumowaniu powyższych rozważań, można stwierdzić, że MTk w epidermie hipokotyla są zorientowane tak jak $PD\varepsilon_{el\ min}$, i to zarówno w strefie I (gdzie są poprzeczne), jak i w strefie bazalnej u podstawy hipokotyla (gdzie są podłużne). Jeżeli poprzeczne MTk (zgodne z $PD\varepsilon_{el\ min}$) warunkują wstawianie poprzecznych MF, $PD\varepsilon_{el\ max}$ będzie pozostawał w kierunku prostopadłym do MF czyli w kierunku podłużnym; efektem będzie utrwalenie istniejącej już orientacji MTk.

Początkowo, w najwyższych strefach hipokotyla, gdzie MTk są poprzeczne, zgodnie z $PD\varepsilon_{el\ min}$ (jak również i naprężeniem, $PD\sigma_{\ min} = PD\varepsilon_{el\ min}$), MF w ścianie posiadają jednolitą (we wszystkich warstwach) poprzeczną orientację. W takiej jednolitej (pod względem ułożenia MF) ścianie, która jest rozciągana w wyniku wzrostu wydłużeniowego, MF stopniowo zmienią swą orientację na coraz bardziej podłużną w warstwach zewnętrznych , choć w wewnętrznych warstwach MF pozostają poprzeczne (przy poprzecznej orientacji MTk). Teoretycznie więc, przy podobnym jak poprzednio układzie $PD\sigma$, układ $PD\varepsilon_{el}$ po pewnym czasie ulegnie zmianie, tj. będzie skośny w stosunku do pierwotnego. Zakładając, że odkształcenie wpływa na MTk na zasadzie sprzężenia zwrotnego, orientacja MTk będzie się zmieniała z poprzecznej na skośną, w kierunku $PD\varepsilon_{el\ min}$. Skośna orientacja MTk będzie orientowała skośnie MF i układ $PD\varepsilon_{el}$ będzie coraz bardziej stromy, w związku z czym orientacja MTk „podążając" za $PD\varepsilon_{el\ min}$ zmieni się również na bardziej stromą. Odkładanie nowych MF bardziej stromo i bierna reorientacja MF w warstwach starszych może spowodować, że maksymalne odkształcenie w końcu będzie w kierunku poprzecznym, a minimalne w kierunku podłużnym. Istotnie, w najstarszej części hipokotyla występują podłużne MTk, czyli zgodnie z założoną tendencją do orientacji MTk według $PD\varepsilon_{el\ min}$. Należy podkreślić, że odkształcenie odwracalne ściany, wpływające na MTk, byłoby wynikiem globalnej orientacji MF w ścianie, a nie tylko w wewnętrznej warstwie. Często w strefie szybko rosnącej różnych organów (korzenie, hipokotyle) orientacja MTk i MF w wewnętrznej warstwie ściany jest taka sama (poprzeczna). W trakcie

wzrostu MTk mogą zmieniać orientację na skośną przy poprzecznym układzie MF w tej warstwie (Baskin *et al.* 1999, Sugimoto *et al.* 2000). Może to odpowiadać sytuacji, gdy zmieniona pod wpływem rozciągania anizotropia odkształcenia w ścianie (bierna reorientacja MF) reorientuje MTk, zanim te zdążą wpłynąć na orientację MF w wewnętrznej warstwie, ze względu na powolne odkładanie nowych MF.

Podsumowując, wyniki otrzymane w niniejszej pracy wskazują na to, że MTk orientują się względem głównych kierunków odkształcenia elastycznego w ścianach komórkowych. Kierunki, w których odkształcenie przyjmuje wartości ekstremalne zależą od anizotropii naprężenia oraz właściwości mechanicznych ściany, zależnych z kolei od ułożenia MF. W konsekwencji, rozkład $PD\varepsilon_{el}$ w komórkach różniących się orientacją MF może być różny przy tym samym rozkładzie $PD\sigma$.

3. CYKLICZNA REORIENTACJA UKŁADÓW MIKROTUBUL KORTYKALNYCH

W komórkach epidermy orientacja MTk jest do pewnego stopnia zmienna nawet na małych obszarach (Ryc.16a), nie różniących się szybkością wzrostu ani wiekiem lub stopniem dojrzałości komórek, co szczególnie jest widoczne w histogramach przedstawiających orientację MTk w pasach pobranych z jednego hipokotyla (Ryc.19). Zmienność układów MTk niezależnie od działania czynników (endo- lub egzogennych) została wykazana również w hipokotylu *Arabidopsis* (Buschmann *et al.* 2004, Le *et al.* 2005) oraz koleoptyli kukurydzy (Fisher i Schopfer 1998).

Przyczyną zmienności może być niesynchroniczność autonomicznych cyklów reorientacji MTk (Hejnowicz 2005). Cykle te mają charakter rotacji, co zostało udowodnione eksperymentalnie w rosnącym hipokotylu *Arabidopsis* (Chan *et al.* 2007). Można więc przypuszczać, że wpływ różnych czynników zarówno egzo- jak i endogennych sprowadza się do regulacji szybkości reorientacji poprzez przyspieszenie cyklu przy określonych zakresach kątowych lub ich spowolnienie (stabilizacja układów w pewnym położeniu). Rozpatrując wpływ odkształcenia ściany komórkowej na MTk można przypuszczać, że w przypadkach kiedy orientacja MTk była zgodna z $PD\varepsilon_{el\ min}$ (w epidermie *in situ*, w strefie I pasów w obecności FC), cykl rotacji przebiegał szybciej przez kierunek, w którym $PD\varepsilon_{el}$ było maksymalne. Można przypuszczać, że w tym położeniu (tzn. wzdłuż $PD\varepsilon_{el\ max}$) MTk są niestabilne. Względnie, MTk w położeniu $PD\varepsilon_{el\ min}$ byłyby stabilizowane poprzez oddziaływanie z białkami MAP, między innymi

z fosfolipazą D warunkującą połączenie z błoną (Dhonukshe *et al.* 2003) lub MAP65 indukującym powstawanie wiązek pomiędzy MTk (Chan *et al.* 1999).

O ile niesynchroniczna cykliczna reorientacja MTk w komórkach epidermy *in situ* jest bardzo prawdopodobna, to trudno jednoznacznie stwierdzić, czy występuje ona również w epidermie izolowanej po długotrwałej inkubacji w buforowanej pożywce. Wśród układów MTk w epidermie izolowanej odnotowano co prawda układy MTk z „przejściami" (Ryc.16d, e), które były między innymi podstawą do wysunięcia hipotezy o cyklicznej reorientacji (Hejnowicz 2005), jednak nie stanowią one dowodu bezpośredniego na istnienie takiej reorientacji. Prawdopodobne jest, że wyizolowanie epidermy z organu (czego skutkiem był wypływ auksyny) spowodowało przejściową synchronizację cyklów: niezależnie od strefy na pasach MTk są przejściowo podłużne. Taką synchronizację odnotowano również w segmentach koleoptyli, które inkubowano w roztworze bez dodatku auksyny (Takesue i Shibaoka 1998). Dalsza reorientacja podłużnych układów MTk po wyizolowaniu epidermy z hipokotyla słonecznika (po >2h) może świadczyć o tym, że układy są niestabilne i dążą do takiej orientacji, która byłaby zgodna z $PD\varepsilon_{el.}$ Gdy ją osiągną, wtedy ulegają względnej stabilizacji, prawdopodobnie w wyniku tego od 12 do 18h kształt histogramów nie ulega większej zmianie.

W rosnących komórkach epidermy hipokotyla czas potrzebny na wykonanie pełnego obrotu przez cały układ MTk może wynosić od 3 do 13h (Chan *et al.* 2007). Nie można więc wykluczyć możliwości, że MTk po 12-18h inkubacji zaprzestają rotacji, a być może jedynie szybkość rotacji ulega znacznemu spowolnieniu.

4. ZNACZENIE MIKROTUBUL KORTYKALNYCH DLA CHIRALNOŚCI STRUKTURY ŚCIANY I JEJ WZROSTU

Jakie znaczenie może mieć rotacja układu MTk na teksturę ściany komórkowej? Wiadomo, że ściana komórkowa epidermy łodyg jest ścianą helikoidalną (Roland *et al.* 1982, Roland *et al.* 1987). Zmienność orientacji MTk, która może wskazywać na cykliczną rotację układów MTk, jest najczęściej obserwowana właśnie w tej tkance. Biorąc pod uwagę fakt, że MTk determinują poruszanie się syntaz celulozowych w błonie, najprostszym wytłumaczeniem struktury helikoidalnej byłaby rotacja MTk, co jednak nie wyklucza mechanizmu samoskładania się układu MF w teksturę helikoidalną (Reis *et al.* 1991, Fisher i Cyr 1998, Emons i Mulder 2000, Hejnowicz 2006). Interesującym jest, że tam gdzie orientacja MTk jest jednolita (miękisz łodyg, strefa

elongacyjna korzenia) – ściana komórkowa jest albo jednowarstowowa z MF zorientowanymi wyłącznie poprzecznie albo składa się z kilku warstw, w których przeważają poprzeczne MF (Lang *et al.* 1982, Zhu *et al.* 1998, Sugimoto *et al.* 2000, Baskin *et al.* 2004).

W epidermie hipokotyla słonecznika ściana jest helikoidalna. Zakładając, że MTk w swym cyklu rotacji zmniejszają szybkość rotacji przy pewnych zakresach kątów, można się spodziewać, że albo więcej MF będzie odkładanych przy tej orientacji (Hejnowicz *et al.* 2006) albo będą one dłuższe (Wasteneys 2004), co spowoduje silniejszy wzrost w kierunku prostopadłym do tej orientacji. W tym kontekście można się spodziewać, że układy MTk o określonym typie chiralności w hipokotylu słonecznika (na przykład typu Z „na prawo" w strefie III) będą faworyzowały wzrost helikalny (spiralny), wskutek czego epiderma powinna być skręcona „na lewo", podobnie jak w przypadku mutantów *Arabidopsis* (Furutani *et al.* 2000, Thitamadee *et al.* 2002, Buschmann *et al.* 2004). Takiej zależności jednak nie stwierdzono w hipokotylach słonecznika; w większości (80-95%) przypadków epiderma nie jest skręcona, jedynie w 5-20% epiderma tworzyła lewoskrętną (typu S) helisę (Burian 2007). Z rozważań teoretycznych Schulgasser'a i Witztum'a (2004) wynika, że zależność pomiędzy wzrostem spiralnym a teksturą ściany komórkowej nie jest tak prosta jak wcześniej przypuszczano (Furutani *et al.* 2000). Kąt skręcenia osi odkształcenia, zależy od tego czy dany układ (komórka) jest izolowany czy też połączony jest z innymi w kolumny, czy szeregi jak to ma miejsce w tkance. Takie połączenie powoduje zmniejszenie kąt skręcenia; na przykład obliczono, że połączenie 8 prostopadłościanów (z helikalnymi wzmocnieniami) w podwójny szereg powoduje zmniejszenie kąta skręcenia ponad trzykrotnie, w stosunku do skręcenia jakie byłoby obserwowane w izolowanym prostopadłościanie (Schulgasser i Witztum 2004). Podobna sytuacja może mieć miejsce w hipokotylu słonecznika. Przewaga (70%) orientacji typu Z niekoniecznie musi być wystarczająca do skręcenia osi wzrostu, być może 30% komórek z orientacją MTk typu S powstrzymują skręcenie.

V. Wnioski

1. Wzdłuż hipokotyla słonecznika istnieje gradient szybkości wzrostu wydłużeniowego, szybkość ta maleje w kierunku bazalnym hipokotyla.

2. Orientacja MTk w epidermie *in situ* zależy od położenia na hipokotylu: w strefie I leżącej najbliżej węzła liścieniowego MTk są poprzeczne i skośne (mniej strome), przy czym orientacje skośne S i Z występują z podobną częstością; w kierunku bazalnym istnieje tendencja do zaniku orientacji poprzecznych i zwiększenia częstości występowania orientacji skośnych (bardziej stromych) z wyraźną dominacją orientacji Z (strefa III).

3. Izolacja epidermy z hipokotyli powoduje szybką (widoczną już po 0.5h) reorientację MTk: orientacje poprzeczne i skośne zostają zastąpione podłużnymi. Proces ten postępuje do 2h po izolacji, po czym tendencja w reorientacji zostaje odwrócona: częstość występowania orientacji skośnych i poprzecznych ulega zwiększeniu i w 6h układ MTk przypomina ten w epidermie *in situ*. W ciągu następnych godzin (do 18h) układ ulega jedynie niewielkim zmianom polegającym na wyodrębnieniu się orientacji skośnych S w strefie III.

4. Pasy epidermy inkubowane przez 12-14h w buforowanej pożywce, a następnie naprężane wydłużają się z szybkością zależną od pH. Przy pH 4.5 szybkość wzrostu jest największa, wzdłuż pasów istnieje dodatkowo gradient szybkości wydłużania: strefa I wydłuża się najszybciej, strefa III najwolniej. Przy pH 6.5 wzrost praktycznie nie występuje w żadnej strefie. Nienaprężane pasy epidermy nie rosną lub rosną z nieznaczną szybkością.

5. Orientacja MTk w pasach epidermy inkubowanych przez 12-14h w buforowanej pożywce nie zależy od szybkości wzrostu indukowanego pH buforu i naprężeniem: nie stwierdzono znaczących różnic w orientacji MTk pomiędzy pasami naprężanymi przez 1h a nienaprężanymi.

6. Orientacja MTk w pasach epidermy inkubowanych przez 12-14h w buforowanej pożywce nie zależy od pH, w niewielkim stopniu zależy od rodzaju buforu.

7. Fuzikokcyna nie powoduje przyspieszenia wzrostu wydłużeniowego w naprężanych pasach preinkubowanych przez 12-14h w niebuforowanej pożywce, natomiast zwiększa znacząco szybkość wydłużania w naprężanych pasach preinkubowanych przez 1h. Szybkość wzrostu indukowanego przez FC po krótkotrwałej preinkubacji nie zależy od strefy pasa.

8. Naprężanie pasów inkubowanych przez 1h w niebuforowanej pożywce bez FC zwiększa szybkość wzrostu jedynie w niewielkim stopniu.

9. Orientacja MTk w pasach epidermy preinkubowanych przez 1h w niebuforowanej pożywce zmienia się wraz z szybkością wzrostu indukowanego FC i naprężeniem: orientacje podłużne zanikają a następuje zwiększenie częstości występowania orientacji poprzecznych i mniej stromych w porównaniu do pasów nienaprężanych.

10. Fuzikokcyna wpływa na orientację MTk niezależnie od wzrostu: w pasach nienaprężanych (nierosnących) powoduje zwiększenie częstości występowania orientacji poprzecznych i mniej stromych w porównaniu do pasów inkubowanych bez FC.

11. Naprężanie pasów inkubowanych przez 1h w niebuforowanej pożywce bez FC powoduje sporadyczne zmiany w orientacji MTk: zaznacza się tendencja do zwiększania częstości występowania orientacji poprzecznych w strefie I, w pozostałych strefach – orientacji podłużnych.

12. Częstość występowania orientacji MTk poprzecznych nie zależy od szybkości wzrostu indukowanego FC, natomiast taka zależność istnieje przy orientacjach podłużnych: występują one w pasach niewydłużających się (nienaprężanych), sporadycznie zaś w pasach w wydłużających się.

13. Uzyskane wyniki falsyfikują hipotezę Schopfera, że orientacja MTk zależy od kierunku wzrostu.

LITERATURA

Abe H, Funada R, Imaizumi H, Ohtani J, Fukuzawa K. 1995. Dynamic changes in the arrangement of cortical microtubules in conifer tracheids during differentiation. Planta 197: 418-421.

Abel S, Theologis A. 1996. Early genes and auxin action. Plant Physiology 111: 9-17.

Akashi T, Shibaoka H. 1991. Involvement of transmembrane proteins in the association of cortical microtubules with the plasma membrane in tabacco BY-2 cells. Journal of Cell Science 98: 169-174.

Alberts, B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 1999. Podstawy Biologii Komórki. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.

Azimzadeh J, Traas J, Pastuglia M. 2001. Molecular aspects of microtubule dynamics in plants. Current Opinion in Plant Biology 4: 513-519.

Baas PW, Karabay A, Qiang L. 2005. Microtubules cut and run. Trends in Cell Biology 15: 518-524.

Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA. 2001. Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 98: 10037-10041.

Barroso C, Chan J, Allan V, Doonan J, Hussey P, Lloyd CW. 2000. Two kinesin-related proteins associated with the cold-stable cytoskeleton of carrot cells: Characterization of a novel kinesin, DcKRP120-2. The Plant Journal 24: 859-868.

Baskin TI. 2001. On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: a review and a model. Protoplasma 215: 150-171.

Baskin TI. 2005. Anisotropic expansion of the plant cell wall. Annual Review of Cell and Developmental Biology 21: 203-222.

Baskin TI, Beemster GTS, Judy-March JE, Marga F. 2004. Disorganization of cortical microtubules stimulates tangential expansion and reduces the uniformity of cellulose microfibril alignment among cells in the root of Arabidopsis. Plant Physiology 135: 2279-2290.

Baskin TI, Meekes HTHM, Liang BM, Sharp RE. 1999. Regulation of growth anisotropy in well-watered and water-stressed maize roots. II. Role of cortical microtubules and cellulose microfibrils. Plant Physiology 119: 681-692.

Bauman D. 2002. Wykorzystanie metod spektroskopwych do badania ciekłych kryształów. Postępy Fizyki 53: 169-180.

Blackman LM, Overall RL. 1995. Electric fields affect the orientation of cortical microtubules and cell expansion in pea callus. Protoplasma 189: 256-266.

Bunney TD, De Boer AH, Levin M. 2003. Fusicoccin signaling reveals 14-3-3 protein function as a novel step in left-right pattering during amphibian embryogenesis. Development 130: 4847-4858.

Burian A. 2007. Chiral changes of cortical microtubule orientations in epidermis of sunflower hypocotyls. The effect of blue and red light. Acta Societatis Botanicorum Poloniae (w druku).

Burk DH, Liu B, Zhong R, Morrison WH, Ye ZH. 2001. A katanin-like protein regulates normal cell wall biosynthesis and cell elongation. The Plant Cell 13: 807-827.

Burk DH, Ye ZH. 2002. Alteration of oriented deposition of cellulose microfibrils by mutation of a katanin-like microtubule-severing protein. The Plant Cell 14: 2145-2160.

Buschmann H, Fabri CO, Hauptmann M, Hutzer P, Laux T, Lloyd CW, Schäffner AR. 2004. Helical growth of the *Arabidopsis* mutant *tortifolia1* reveals a plant-specific microtubule-associated protein. Current Biology 14: 1515-1521.

Chalfie M, Tu T, Euskirchen G, Wand WW, Prasher DC. 1994. Green Fluorescent Protein as a marker for gene expression. Science 263: 802-805.

Chan J, Calder GM, Doonan JH, Lloyd CW. 2003. EB1 reveals mobile microtubule nucleation sites in *Arabidopsis*. Nature Cell Biology 5: 967-971.

Chan J, Calder GM, Fox S, Lloyd CW. 2007. Cortical microtubule arrays undergo rotary movements in *Arabidopsis* hypocotyl epidermal cells. Nature Cell Biology 9: 171-175.

Chan J, Jensen CG, Jensen LCW, Bush M, Lloyd CW. 1999. The 65-kDa carrot microtubule-associated protein forms regularly arranged filamentous cross-bridges between microtubules. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 96: 14931-14936.

Chanliaud E, Burrows KM, Jeronimidis G, Gidley MJ. 2002. Mechanical properties of primary plant cell analogues. Planta 215: 989-996.

Cleland RE, Buckley G, Nowbar S, Lew NM, Stilemetz C, Evans ML, Rayle DL. 1991. The pH profile for acid-induced elongation of coleoptile and epicotyl sections is consistent with the acid-growth theory. Planta 186: 70-74.

Cleland RE, Cosgrove D, Tepfler M. 1987. Long-term acid-induced wall extension, in an *in-vitro* system. Planta 170:379-385.

Cosgrove D. 1986. Biophysical control of plant cell growth. Annual Review of Plant Physiology 37: 377-406.

Cosgrove D. 1987. Wall relaxation and the driving forces for cell expansive growth. Plant Physiology 84: 561-564.

Cosgrove D. 2000. Loosening of plant cell walls by expansins. Nature 407: 321-326.
Cyr RJ. 1994. Micotubules in plant morphogenesis: Role of the cortical array. Annual Reviews of Cell Biology 10:153-180.

Dixit R, Chang E, Cyr R. 2006a. Establishment of polarity during organization of the acentrosomal plant cortical microtubule array. Molecular Biology of the Cell 17: 1298-1305.

Dixit R, Cyr R. 2004a. The cortical microtubule array: from dynamics to organization. The Plant Cell 16: 2546-2552.

Dixit R, Cyr R. 2004b. Encounters between dynamic cortical microtubules promote ordering of the cortical array through angle-dependent modification of microtubule behaviour. The Plant Cell 16:3274-3284.

Dixit R, Cyr R, Gilroy S. 2006b. Using intrinsically fluorescent proteins for plant cell imaging. The Plant Journal 45: 599-615.

Dhonukshe P, Laxalt AM, Goedhart J, Gadella TWJ, Munnik T. 2003. Phospholipase D activation correlates with microtubule reorganization in living plant cells. The Plant Cell 15: 2666-2679.

Ehrhardt D. 2003. GFP technology for live cell imaging. Current Opinion in Plant Biology 6: 622-628.

Ehrhardt DW, Shaw SL. 2006. Microtubule dynamics and organization in the plant cortical array. Annual Review of Plant Biology 57: 859-875.

Emons AMC, Derksen J, Sassen MMA. 1992. Do microtubules orient plant cell wall microfibrils? Physiologia Plantarum 84: 486-493.

Emons AMC, Mulder BM. 2000. How the deposition of cellulose microfibrils builds cell wall architecture. Trends in Plant Science 5: 35-40.

Fischer K, Schopfer P. 1997. Interaction of auxin, light, and mechanical stress in orienting microtubules in relation to tropic curvature in the epidermis of maize coleoptiles. Protoplasma 196: 108-116.

Fischer K, Schopfer P. 1998. Physical strain-mediated microtubule reorientation in the epidermis of gravitropically or phototropically stimulated maize coleoptiles. The Plant Journal 15: 119-123.

Fisher DD, Cyr RJ. 1998. Extending the microtubule/microfibril paradigm. Plant Physiology 116: 1043-1051.

Fisher DD, Cyr RJ. 2000. Mechanical forces in plant growth and development. Gravitational and Space Biology Bulletin 13: 67-73.

Furutani I, Watanabe Y, Prieto R, Masukawa M, Suzuki K, Naoi K, Thitamadee S, Shikanai T, Hashimoto T. 2000. The SPIRAL genes are required for directional control of cell elongation in *Arabidopsis thaliana.* Development 127: 4443-4453.

Geitmann A, Hush JM, Overall RL. 1997. Inhibition of ethylene biosynthesis does not block microtubule re-orientation in wounded pea roots. Protoplasma 198: 135-142.

Gertel ET, Green PB. 1977. Cell growth pattern and wall microfibrillar arrangement. Plant Physiology 60: 247-254.

Gondko R, Zgirski A, Adamska M. 2001. Biostatystyka w zadaniach. Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego.

Granger CL, Cyr RJ. 2001. Spatiotemporal relationship between growth and microtubule orientation as revealed in living root cells of *Arabidopsis thaliana* transformed with green-fluorescent-protein gene construct GFP-MBD. Protoplasma 216: 201-214.

Green PB. 1962. Mechanism for plant cellular morphogenesis. Science 138:1404-1405.

Hager A, Debus G, Edel HG, Stransky H, Serrano R. 1991. Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H^+-ATPase. Planta 185: 527-537.

Hanson MR, Köhler RH. 2001. GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation. Journal of Experimental Botany 52: 529-539.

Hashimoto T. 2002. Molecular genetic analysis of left-right handedness in plants. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B 357: 799-808.

Hashimoto T, Kato T. 2006. Cortical control of plant microtubules. Current Opinion in Plant Biology 9: 5-11.

Hejnowicz Z. 2005. Autonomous changes in the orientation of cortical microtubules underlying the helicoidal cell wall of the sunflower hypocotyl epidermis: spatial variation translated into temporal changes. Protoplasma 225: 243-256.

Hejnowicz Z, Borowska-Wykręt D. 2005. Buckling of inner cell wall layers after manipulations to reduce tensile stress: observation and interpretations for stress transmission. Planta 220: 465-473.

Hejnowicz Z, Burian A, Dobrowolska I, Kolano E. 2006. Orientational variability of parallel arrays of cortical microtubules under the outer cell wall of the *Helianthus* hypocotyl epidermis. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 75: 201-205.

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 Regulation 19: 31-44.

Hejnowicz Z, Sievers A. 1992. Tissue tension – a factor in the regulation of cell wall growth. Plant Cell Walls as Biopolymers with Physiological Functions 67-72.

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 sunflower. Journal of Experimental Botany 46: 1045-1053.

Hejnowicz Z, Sievers A. 1996a. Tissue stresses in organs of herbaceous plants III. Elastic properties of the tissues of sunflower hypocotyl and origin of tissue stresses. Journal of Experimental Botany 47: 519-528.

Hejnowicz Z, Sievers A. 1996b. Acid-induced elongation of Reynouria stems requires tissue stresses. Physiologia Plantarum 98: 345-348.

Himmelspach R, Nick P. 2001. Gravitropic microtubule reorientation can be uncoupled from growth. Planta 212: 184-189.

Himmelspach R, Williamson RE, Wasteneys GO. 2003. Cellulose microfibril alignment recovers from DCB-induced disruption despite microtubule disorganization. The Plant Journal 36: 565-575.

Himmelspach R, Wymer CL, Lloyd CW, Nick P. 1999. Gravity-induced reorientation of cortical microtubules observed *in vivo*. The Plant Journal 18: 449-453.

Hush JM, Hawes CR, Overall RL. 1990. Interphase microtubule re-orientation predicts a new cell polarity in wounded pea roots. Journal of Cell Science 96: 47-61.

Hush JM, Overall R L. 1991. Electrical and mechanical fields orient cortical microtubules in higher plant tissues. Cell Biology International Reports 15: 551-560.

Hush JM, Wadswarth P, Callaham DA, Hepler PK. 1994. Quantification of microtubule dynamics in living plant cells using fluorescence redistribution after photobleaching. Jouranl of Cell Science 107: 775-784.

Hohl M, Schopfer P. 1992. Physical extensibility of maize coleoptile cell walls: apparent plastic extensibility is due to elastic hysteresis. Planta 187: 498-504.

Ikushima T, Shimmen T. 2005. Mechano-sensitive orientation of cortical microtubules during gravitropism in azuki bean epicotyls. Journal of Plant Research 118: 19-26.

Ingber DE. 2003a. Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. Journal of Cell Science 116: 1157-1173.

Ingber DE. 2003b. Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. Journal of Cell Science 116: 1397-1408.

Iwata K, Hogetsu T. 1989. The effects of light irradiation on the orientation of microtubules in seedlings of *Avena sativa* L. and *Pisum sativum* L. Plant and Cell Physiology 7: 1011-1016.

Joshi HC, Palevitz BA. 1996. γ- Tubulin and microtubule organization in plants. Trends in Cell Biology 6: 41-44.

Karcz W, Stolarek J, Piertuszka M, Małkowski E. 1990. The dose-response curves for IAA induced elongation growth and acidification of the incubation medium of *Zea mays* coleoptile segments. Physiologia Plantarum 80: 257-261.

Keller CP, Van Volkenburgh E. 1998. Evidence that auxin-induced growth of tobacco leaf tissues does not involve cell wall acidification. Plant Physiology 118: 557-564.

Kost B, Chua NH. 2002. The plant cytoskeleton: vacuoles and cell walls make the difference. Cell 108: 9-12.

Kropf DL, Williamson RE, Wasteneys GO. 1997. Microtubule orientation and dynamics in elongating characean internodal cells following cytosolic acidification, induction of pH bands, or premature growth arrest. Protoplasma 197: 188-198.

Kutschera U. 1989. Tissue stresses in growing plant organs. Physiologia Plantarum 77: 157-163.

Kutschera U. 1990. Cell wall synthesis and elongation growth in hypocotyls of *Helianthus annus* L. Planta 181: 316-323.

Kutschera U. 1994. The current status of the acid-growth hypothesis. New Phytologist 126: 549-569.

Kutschera U. 2000. Cell expansion in plant development. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 12: 65-95.

Kutschera U, Bergfeld R, Schopfer P. 1987. Cooperation of epidermis and inner tissues in auxin-mediated growth of maize coleoptiles. Planta 170: 168-180.

Kutschera U, Schopfer P. 1985a. Evidence against the acid-growth theory of auxin action. Planta 163: 483-493.

Kutschera U, Schopfer P. 1985b. Evidence for the acid-growth theory of fusicoccin action. Planta 163: 494-499.

Kwiatkowska M. 1972. Changes in the diameter of microtubules connected with the autonomous rotary motion of the lipotubuloids (elaioplast). Protoplasma 75: 345-357.

Kwiatkowska M, Popłonska K, Stepinski D, Hejnowicz Z. 2006. Microtubules with different diameter, protofilament number and protofilament spacing in *Ornithogalum umbellatum* ovary epidermis cells. Folia Histochemica et Cytobiologia 44: 133-138.

Lang JM, Eisinger WR, Green PB. 1982. Effects of ethylene on the orientation of microtubules and cellulose microfibrils of pea epicotyl cells with polylamellate cell walls. Protoplasma 110: 5-14.

Laskowski M. 1990. Microtubule orientation in pea stem cells: a change in orientation follows the initiation of growth rate decline. Planta 181: 44-52.

Le J, Vandenbussche F, De Cnodder T, Van Der Straeten D, Verbelen JP. 2005. Cell elongation and microtubule behaviour in the Arabidopsis hypocotyls: responses to ethylene and auxin. Journal of Plant Growth Regulation 24: 166-178.

Ledbetter MC, Porter KR. 1963. A "microtubule" in plant fine structure. The Journal of Cell Biology 19: 239-250.

Li Y, Jones L, McQueen-Mason S. 2003. Expansins and cell growth. Current Opinion in Plant Biology 6: 603-610.

Liang BM, Dennings AM, Sharp RE, Baskin TU. 1996. Consistent handedness of microtubule helical arrays in maize and *Arabidopsis* primary roots. Protoplasma 190: 8-15.

Lintilhac PM, Vesecky TB. 1984. Stress-induced alignment of division plane in plant tissues grown in vitro. Nature 307: 363-364.

Lloyd C. 1994. Why should stationary plant cells have such dynamic microtubules? Molecular Biology of the Cell 5: 1277-1280.

Lloyd C. 1996. Gibberellic-acid-induced reorientation of cortical microtubules in living plant cells. Journal of Microscopy 181: 140-144.

Lloyd C. 1999. How I learned to love carrots: the role of the cytoskeleton in shaping plant cells. BioEssays 21: 1061-1068.

Lloyd CW. 2006. Microtubules make tracks for cellulose. Science 312: 1482-1483.

Lloyd CW, Chan J. 2002. Helical microtubule arrays and spiral growth. The Plant Cell 14: 2319-2324.

Lloyd CW, Chan J. 2004. Microtubule and shape of plants to come. Nature Reviews. Molecular Cell Biology 5: 13-22.

Lloyd CW, Hussey P. 2001. Microtubule-associated proteins in plants – why we need a MAP. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2: 40-46.

Lloyd CW, Shaw PJ, Warn RM, Yuan M. 1995. Gibberelic-acid-induced reorientation of cortical microtubules in living cells. Journal of Microscopy 181: 140-144.

Lüthen H, Bigdon M, Botter M. 1990. Reexamination of acid growth theory of auxin action. Plant Physiology 93: 931-939.

Lynch TM, Lintilhac FM. 1997. Mechanical signals in plant development: a new method for single cell studies. Developmental Biology 181: 246-256.

Malerba M, Cerana R, Crosti P. 2003. Fusicoccin induces in plant cells a programmed cell death showing apoptotic features. Protoplasma 222: 113-116.

Maly IV, Borisy GG. 2002. Self-organisation of treadmilling microtubules into a polar array. Trends in Cell Biology 12: 462-465.

Mandelkow EM, Mandelkow E, Milligan A. 1991. Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study. The Journal of Cell Biology 114: 977-991.

Mao G, Buschmann H, Doonan JH, Lloyd CW. 2005. The role of MAP65-1 in microtubules bundling during Zinnia tracheary element formation. Journal of Cell Science 119: 753-758.

Marc J, Granger CL, Brincat J, Fisher DD, Kao T, McCubbin AG, Cyr RJ. 1998. A GFP-MAP4 reporter gene for visualizing cortical microtubule rearrangements in living epidermal cells. The Plant Cell 10: 1927-1940.

Marga F, Grandbois M, Cosgrove DJ, Baskin TI. 2005. Cell wall extension results in the coordinate separation of parallel microfibrils: evidence from scanning electron microscopy and atomic force microscopy. The Plant Journal 43: 181-190.

Mathur J. 2004. Cell shape development in plants. Trends in Plant Science 9: 583-590.

Mathur J, Hülskamp M. 2002. Microtubules and microfilaments in cell morphogenesis in higher plants. Current Biology 12: R669-R676.

Mayumi K, Shibaoka H. 1996. The cyclic reorientation of cortical microtubules on walls with a crossed polylamallate structure: effects of plant hormones and an inhibitor of protein kinases on the progression of the cycle. Protoplasma 195: 112-122.

McKean PG, Vaughan S, Gull K. 2001. The extended tubulin superfamily. Journal of Cell Science 114: 2723-2733.

McQueen-Mason S, Cosgrove D. 1994. Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 91: 6574-6578.

McQueen-Mason S, Cosgrove D. 1995. Expansin mode of action on cell walls. Plant Physiology 107: 87-100.

McQueen-Mason S, Durachko DM, Cosgrove D. 1992. Two endogenous protein that induce cell wall extension in plants. The Plant Cell 4: 1425-1433.

Mentze J, Raymond B, Cohen JD, Rayle DL. 1977. Auxin-induced H^+ secretion in *Helianthus* and its implications. Plant Physiology 60: 509-512.

Murata T, Sonobe S, Baskin TI, Hyodo S, Hasezawa S, Nagata T, Horio T, Hasebe M. 2005. Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of γ-tubulin in higher plants. Nature Cell Biology 7: 961-968.

Nakajima K, Furutani I, Tachimoto H, Matsubara H, Hashimoto T. 2004. *SPIRAL1* encodes a plant-specific microtubule-localized protein required for directional control of rapidly expanding Arabidopsis cells. The Plant Cell 16: 1178-1190.

Neville AC. 1988. A pipe-cleaner molecular model for morphogenesis of helicoidal plant cell walls based on hemicellulose complexity. Journal of Theoretical Biology 131: 243-254.

Nick P, Bergfeld R, Schäfer 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 KJ. 1992. Plant Bionechanics: an engeneering approach to plant form and function. Chicago, IL, USA University of Chicago Press.

Nogales E, Wolf SG, Downing KH. 1998. Structure of the αβ tubulin dimmer by electron crystallography. Nature 391: 199-203.

Nolte T, Schopfer P. 1997. Viscoelastic versus plastic cell wall extensibility in growing seedling organs: a contribution to avoid some misconceptions. Journal of Experimental Botany 317: 2103-2107.

O'Connel CB, Wang Y. 2000. Mammalian spindle orientation and position respond to changes in cell shape in a dynein-dependent fashion. Molecular Biology of the Cell 11: 1765-1774.

Odde D. 1998. Diffusion inside microtubules. European Biophysics Journal 27: 514-520.

Ortega JKE. 1985. Augmented growth equation for cell wall expansion. Plant Physiology 79: 318-320.

Paolillo DJ. 2000. Axis elongation can occur with net longitudinal orientation of wall microfibrils. New Phytologist 145: 449-455.

Paredez AR, Somerville CR, Ehrhardt DW. 2006. Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. Science 312: 1491-1495.

Peters WS, Farm MS, Kopf AJ. 2001. Does growth correlate with turgor-induced elastic strain in stems? A re-evaluation of de Vries' classical experiments. Plant Physiology 125: 2173-2179.

Preuss ML, Delmer DP, Liu B. 2003. The cotton kinesin-like calmodulin-binding protein associates with cortical microtubules in cotton fibers. Plant Physiology 132: 154-160.

Pritchard J, Hetherington PR, Fry SC, Tomos AD. 1993. Xyloglucan endotransglycosylase activity, microfibril orientation and the profiles of cell wall properties along growing regions of maize roots. Journal of Experimental Botany 44: 1281-1289.

Proseus TE, Ortega JKE, Boyer JS. 1999. Separating growth from elastic deformation during cell enlargement. Plant Physiology 119: 775-784.

Quarmby L. 2000. Cellular Samurai: katanin and the severing of microtubules. Journal of Cell Science 113: 2821-2827.

Rayle DL, Cleland RE. 1980. Evidence that auxin-induced growth of soybean hypocotyls involves proton excretion. Plant Physiology 66: 433-437.

Rayle DL, Cleland RE. 1992. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. Plant Physiology 99: 1271-1274.

Rayle DL, Nowbar S, Cleland RE. 1991. The epidermis of the pea epicotyl is not a unique target tissue for auxin-induced growth. Plant Physiology 97: 449-451.

Refrégier G, Pelletier S, Jaillard D, Höfte H. 2004. Interaction between wall deposition and cell elongation in dark-grown hypocotyl cells in Arabidopsis. Plant Physiology 135: 959-968.

Reis D, Vian B, Chanzy H, Roland JC. 1991. Liquid crystal-type assembly of native cellulose-glucuronoxylans extracted from plant ell wall. Biology of Cell 73: 173-178.

Richmond P. Metraux JP, Taiz L. 1980. Cell expansion patterns and directionality of wall mechanical properties in *Nitella*. Plant Physiology 65: 211-217.

Richmond P. 1983. Pattern of cellulose microfibril deposition and rearrangement in *Nitella*: in vivo analysis of a birefringence index. Journal of Applied Polymer Science 37: 107-122.

Roberts IN, Lloyd CW, Roberts K. 1985. Ethylene-induced microtubule reorientations: mediation by helical arrays. Planta 164: 439-447.

Rodionov V, Nadezhdina E, Borisy G. 1999. Centrosomal control of microtubule dynamics. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 96: 115-120.

Roland JC, Reis D, Mosiniak M, Vian B. 1982. Cell wall texture along the growth gradient of the mung bean hypocotyl: ordered assembly and dissipative processes. Journal of Cell Science 56: 303-318.

Roland JC, Reis D, Vian B, Satiat-Jeunemaitre B, Mosiniak M. 1987. Morphogenesis of plant cell walls at the supramolecular level: internal geometry and versatility of helicoidal expression. Protoplasma 140: 75-91.

Sauter M, Seagull RW, Kende H. 1993. Internodal elongation and orientation of cellulose microfibrils and microtubules in deepwater rice. Planta 190: 354-362.

Saxena IM, Brown RM. 2005. Cellulose biosynthesis: current views and evolving concepts. Annals of Botany 96: 9-21.

Schopfer P. 1993. Determination of auxin-dependent pH changes in coleoptile cell walls by a null-point method. Plant Physiology 103: 351-357.

Schulgasser K, Witztum A. 2004. The hierarchy of chirality. Journal of Theoretical Biology 230: 281-288.

Seagull RW. 1985. Changes in microtubule organization and wall microfibril orientation during in vitro cotton fiber development: an immunofluorescent study. Canadian Journal of Botany 64: 1373-1381.

Sedbrook JC. 2004. MAPs in plant cells: delineating microtubule growth dynamics and organisation. Current Opinion in Plant Biology 7: 632-640.

Sedbrook JC, Ehrhardt DW, Fisher SE, Scheible WR, Somerville CR. 2004. The Arabipopsis *SKU6/SPIRAL1* Gene encodes a plus end-localized microtubule-interacting protein involved in directional cell expansion. The Plant Cell 16: 1506-1520.

Shaw SL, Kamyar R, Ehrhardt DW. 2003. Sustained microtubule treadmilling in *Arabidopsis* cortical arrays. Science 300: 1715-1718.

Shibaoka H. 1994. Plant hormone-induced changes in the orientation of cortical microtubules. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 45:527-544.

Somerville C, Bauer S, Brininstool G, Facette M, Hamann T, Milne J, Osborne E, Paredez A, Persson S, Raab T, Vorwerk S, Youngs H. 2004. Toward a systems approach to understanding plantt cell walls. Science 306: 2206-2211.

Staehelin L, Giddings TH. 1982. Membrane-mediated control of cell wall microfibrillar order. Developmental Order: Its origin and regulation. Pages: 133-147.

Stracke R, Böhm KJ, Wollweber L, Tuszynski JA, Unger E. 2002. Analysis of the migration behaviour of single microtubules in electric fields. Biochemical and Biophysical Research Communications 293: 602-609.

Sugimoto K, Himmelspach R, Williamson RE, Wasteneys GO. 2003. Mutation or drug-dependent microtubule disruption causes radial swelling without altering parallel cellulose microfibril deposition in Arabidopsis root cells. The Plant Cell 15: 1414-1429.

Sugimoto K, Williamson RE, Wasteneys GO. 2000. New techniques enable comparative analysis of microtubule orientation, wall texture, and growth rate in intact root of Arabidopsis. Plant Physiology 124: 1493-1506.

Surrey T, Nédélec F, Leibler S, Karsenti E. 2001. Physical properties determining self-organization of motors and microtubules. Science 292: 1167-1171.

Takesue K, Shibaoka H. 1998. The cyclic reorientation of cortical microtubules in epidermal cells of azuki bean epicotyls. Planta 205: 539-546.

Takesue K, Shibaoka H. 1999. Auxin-induced longitudinal-to-transverse reorientation of cortical microtubules in nonelongation epidermal cells of azuki bean epicotyls. Protoplasma 206: 27-30.

Tanimoto E, Fujii S, Yamamoto R, Inanaga S. 2000. Measurement of viscoelastic properties of root cell walls affected by low pH in lateral roots of *Pisum sativum* L. Plant and Soil 26: 21-28.

Thitamadee S, Tuchihara K, Hashimoto T. 2002. Microtubule basis for left-handed helical growth in *Arabidopsis*. Nature 417: 193-196.

Tian GW, Smith D, Glück S, Baskin TI. 2004. Higher plant cortical microtubule array analyzed in vitro in the presence of the cell wall. Cell Motility and the Cytoskeleton 57: 26-36.

Tode K, Lüthen H. 2001. Fusicoccin- and IAA-induced elongation growth share the same pattern pf K^+ dependnce. Journal of Experimental Botany 52: 251-255.

Ueda K, Matsuyama T, Hashimoto T. 1999. Visualization of microtubules in living cells of transgenic Arabidopsis thaliana. Protoplasma 206: 201-206.

Ueda K, Matsuyama T. 2000. Rearrangement of cortical microtubules from transverse to oblique or longitudinal in living cells of transgenic *Arabidopsis thaliana*. Protoplasma 213: 28-38.

Van Bruaene N, Joss G, Van Oostveldt P. 2005. Reorganisation and in vivo dynamics of microtubles during Arabidopsis root hair development. Plant Physiology 136: 3905-3919.

Van Volkenburgh, Schmidt MG, Cleland RE. 1985. Loss of capacity for acid-induced wall loosening as the principal cause of the cessation of cell enlargement in light-grown bean leaves. Planta 163: 500-505.

Vesper MJ. 1985. Use of a pH-response curve for growth to predict apparent wall pH in elongating segments of maize coleoptiles and sunflower hypocotyls. Planta 166: 96-104.

Vincent JF. 1999. From cellulose to cell. The Journal of Experimental Biology 202: 3263-3268.

Vorobjew IA, Rodionov VI, Maly IV, Borisy GG. 1999. Contribution of plus and minus pathways to microtubule turnover. Journal of Cell Science 112: 2277-2289.

Vos JW, Dogterom M, Emons AMC. 2003. Microtubules become more dynamic but not shorter during preprophase band formation: a possible "search-and-capture" mechanism for microtubule translocation. Cell Motility and the Cytoskeleton 38: 278-286.

Wang L, Brown A. 2002. Rapid movement of microtubules in axons. Current Biology 12: 1496-1501.

Wang N, Butler JP, Ingber DE. 1993. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. Science 260: 1124-1127.

Wang N, Naruse K, Stamenović D, Fredberg JJ, Mijailovich SM, Tolić-Nørrelykke, Polte T, Mannix R, Ingber DE. 2001. Mechanical behavior in living cells consistent with the tensegrity model. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 98: 7765-7770.

Wang W, Vignani R, Scali M, Sensi E, Cresti M. 2004. Post-translational modifications of α-tubulin in *Zea mays* L. are highly tissue specific. Planta 218: 460-465.

Westeneys GO. 2002. Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-ordered? Journal of Cell Science 115: 1345-1354.

Wasteneys GO. 2004. Progress in understanding the role of microtubules in plant cells. Current Opinion in Plant Biology 7: 651-660.

Wasteneys GO, Yang Z. 2004. New views on the plant cytoskeleton. Plant Physiology 136: 3884-3891.

Whittington AT, Vugrek O, Wei KJ, Hasenbein NG, Sugimoto K, Rashbrooke MC, Wasteneys GO. 2001. MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants. Nature 411: 610-613.

Wiedemeier AMD, Judy-March JE, Hocart CH, Wasteneys GO, Williamson RE, Baskin TI. 2002. Mutant alleles of Arabidopsis RADIALLY SWOLLEN 4 and 7 reduce growth anisotropy without altering the transverse orientation of cortical microtubules or cellulose microfibrils. Development 129: 4821-4830.

Williamson RE. 1990. Alignment of cortical microtubules by anisotropic wall stresses. Australian Journal of Plant Physiology 17: 601-613.

Williamson RE. 1991. Orientation of cortical microtubules in interphase plant cells. International Reviews of Cytology 129: 135-206.

Winch S, Pritchard J. 1999. Acid-induced wall loosening is confined to the accelerating region of the root growing zone. Journal of Experimental Botany 50: 1481-1487.

Wolters-Arts AMC, Sassen MMA. 1991. Deposition and reorientation of cellulose microfibrils in elongating cells of *Petunia* stylar tissue. Planta 185: 179-189.

Wymer CL, Wymer SA, Cosgrove DJ, Cyr RJ. 1996. Plant cell growth responds to external forces and the response requires intact microtubules. Plant Physiology 110: 425-430.

Yuan M, Shaw PJ, Warn R, Lloyd CW. 1994. Dynamic reorientation of cortical microtubules, from transverse to longitudinal, in living plant cells. . Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 91: 6050-6053.

Yuan M, Warn RM, Shaw PJ, Lloyd CW. 1995. Dynamic microtubules under the radial and outer tangential walls of microinjected pea epidermal cells observed by computer reconstruction. The Plant Journal 7: 17-23.

Zandomeni K, Schopfer P. 1993. Reorientation of microtubules at the outer epidermal wall of maize coleoptiles by phytochrome, blue-light photoreceptor, and auxin. Protoplasma 173: 103-112.

Zandomeni K, Schopfer P. 1994. Mechanosensory microtubule reorientation in the epidermis of maize coleoptiles subjected to bending stress. Protoplasma 182: 96-101.

Zhong R, Burk DH, Morrison III WH, Ye ZH. 2002. A kinesin-like protein is essential for oriented deposition of cellulose microfibrils and cell wall strength. The Plant Cell 14: 3101-3117.

Zhu T, Lucas WJ, Rost TL. 1998. Directional cell-to-cell communication in the Arabidopsis root apical meristem I. An ultrastructural and functional analysis. Protoplasma 203: 35-47.