

ROLA KOMUNIKACJI/IZOLACJI SYMPLASTOWEJ W RÓŻNICOWANIU KOMÓREK NA WYBRANYCH PRZYKŁADACH

SYMPLASMIC COMMUNICATION/ISOLATION
AND PLANT CELL DIFFERENTIATION

Marek MARZEC, Ewa Urszula KURCZYŃSKA

Zakład Biologii Komórki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,
Uniwersytet Śląski, Katowice

Streszczenie: Organizm roślinny charakteryzuje się szczególną cechą, jaką jest występowanie plazmodesm (PD) między sąsiadującymi ze sobą komórkami. Badania ostatnich lat pokazały, że komunikacja za pośrednictwem plazmodesm lub jej brak odgrywa istotną rolę w regulacji różnicowania komórek roślinnych. Okazało się bowiem, że przez PD przemieszczają się białka oraz RNA (w tym mRNA), a więc cząsteczki mogące wpływać na różnicowanie komórek. W niniejszym artykule opisano wyniki badań nad rolą izolacji symplastowej w procesie różnicowania trichoblastów i atrichoblastów na przykładzie korzeni *Arabidopsis thaliana*. Przedstawiono wyniki badań nad zmianami komunikacji symplastowej między komórkami woreczka zalążkowego przed i po zapłodnieniu na przykładzie *Torenia fournieri*. Opisano również wyniki badań, które wykazały związek między wykształcaniem się domen symplastowych a różnicowaniem komórek i tkanek zarodka zygotycznego oraz izolacji symplastowej w nasieniu *Arabidopsis thaliana*. Informacje te poprzedzono podstawowymi wiadomościami na temat transportu symplastowego. Opisano podstawowe parametry transportu symplastowego zachodzącego w drodze dyfuzji. Przedstawiono wyniki badań, które wykazały przemieszczanie się przez PD białek, takich jak: KNOTTED1, DEFICIENS, CLAVATA3 oraz LEAFY, a także przemieszczanie się cząsteczek RNA wyciszających geny (siRNA i miRNA). W artykule tym przedstawiono również podstawowe informacje na temat dynamiki transportu symplastowego ze szczególnym uwzględnieniem syntezy kalozy.

Słowa kluczowe: domeny symplastowe, izolacja symplastowa, różnicowanie komórek, transport symplastowy.

Summary: The unique feature of plant organisms is the presence of plasmodesmata (PD) between neighboring cells. Such plasmodesmata continuum which exists within the plant body is termed symplasm. Classical view of plasmodesmata as static structures within the cell walls between neighboring cells must be reevaluated. According to our recent knowledge symplast is divided into functional domain. It appeared that symplasmic isolation/communication of cells or group of cells (symplasmic domains or symplasmic fields) is necessary for its proper differentiation within the plant body. Namely, plasmodesmata as a highly flexible structures regulate the diffusion of molecules including proteins and mRNA. This confirms the role of PD in the regulation of cells differentiation. For better understanding the role of symplasmic

isolation/communication in cell differentiation basic information about plasmodesmata, symplasm and symplasmic transport are also described in presented paper. Some parameters of molecules diffusion in water, through plasmalemma and plasmodesmata, dynamic of plasmodesmata closure and opening (synthesis of callose and its digestion) under different conditions were also provided. Information about movement of proteins (KNOTTED 1, DEFICIENS, CLAVATA 3, LEAFY, APETALA 3) and RNA between different zones of apical meristem (tunica and corpus) were described in details, as these results were among the first which suggested that movement of signaling molecules through plasmodesmata exist and can influence cell differentiation. In presented article information about the role of symplasmic isolation during the differentiation of trichoblast and atrichoblast cells, changes within the embryo sac in connection with the fertilization, double fertilization, zygote and seed development were described. During the differentiation of trichoblasts and atrichoblasts the importance of signals movement between cells through plasmodesmata and changes in symplasmic communication were described on the example of *Arabidopsis* root [13, 78]. Genetic control of hair cells differentiation and the role of symplasmic communication in this process were also shown. In the case of embryo sac development of *Torenia fournieri* results from experiments where symplasmic communication was investigated with the use of fluorochrome of low molecular weight (LYCH) and dextrans (3, 10 and 40 kDa) were described [12, 22]. During the development of *Arabidopsis thaliana* seed, changes in plasmodesmata SEL were also shown [77]. The importance of symplasmic communication during zygotic and somatic embryogenesis were briefly described on the example of *Arabidopsis* embryo development. Presented article shows information about the symplasmic isolation between explant and somatic embryo. Moreover, description of the analysis of *ise2* mutants in connection with the symplasmic isolation was also presented. From all described examples it is evident that cell differentiation is connected with the decrease of the symplasmic communication between cells which undergo different fate during the development. It is also important to notice that plasmodesmata are not passive channels, but critical players in gene regulation, controlling intercellular transport of molecules between particular cells during development [94].

Key words: cell differentiation, symplasmic domains, symplasmic isolation, symplasmic transport.

1. WSTĘP

Organizm roślinny rozwija się z zapłodnionej komórki jajowej. Po procesie zapłodnienia, czyli połączenia ze sobą gamety męskiej i żeńskiej, w wyniku późniejszych podziałów, roślina staje się organizmem wielokomórkowym. Jest to skomplikowany i w pełni zintegrowany system współdziałających ze sobą tkanek i organów. W trakcie rozwoju i wzrostu rośliny, z grupy początkowo podobnych do siebie komórek, powstają komórki wyspecjalizowane – różniące się od siebie pod względem budowy, jak i pełnionej funkcji. Proces specjalizacji nazywamy różnicowaniem lub dyferencjacją. W wyniku tego procesu powstaje około 40 różnych typów komórek [55]. Realizacja konkretnego programu rozwojowego komórki zależy od ekspresji ściśle określonych genów. Jednak pojawia się pytanie, jak to możliwe, iż komórki leżące w swoim sąsiedztwie mogą uaktywnić i utrzymać tak różne drogi rozwoju prowadzące do wytworzenia układu tkanek oraz narządów budujących organizm? Wyniki badań przeprowadzonych w ostatnich latach wskazują, że jednym z mechanizmów regulujących ten proces jest zjawisko izolacji symplastowej, dzięki której komórka odcina dopływ sygnałów płynących do niej drogą symplastową z otaczających komórek, co pozwala jej realizować indywidualny program rozwojowy.

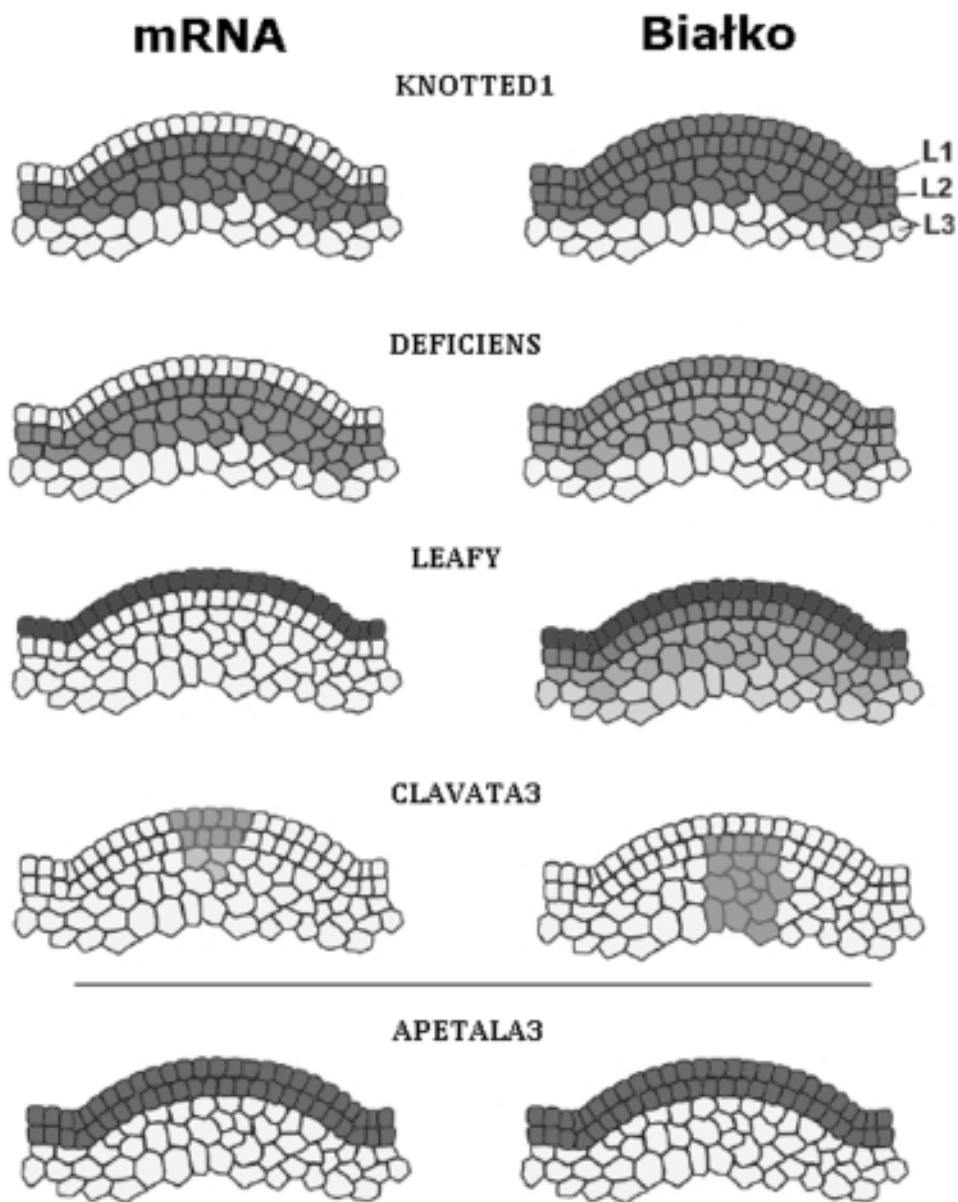
2. TRANSPORT SYMPLASTOWY

Przez transport symplastowy należy rozumieć transport każdej substancji w systemie połączonych protoplastów komórek. Funkcje połączeń spełniają plazmodesmy, czyli „tunele” znajdujące się w ścianach sąsiadujących ze sobą komórek, którymi przechodzą błony ER (retikulum endoplazmatycznego) oraz pasma cytoplazmy [52, 53, 70, 75]. Kanał plazmodesmy jest wyścielony błoną komórkową, a w jego centrum obecny jest cylinder nazywany desmotubulą, który jest utworzony przez retikulum endoplazmatyczne otoczone białkami. Transport symplastowy może zachodzić między komórkami każdej tkanki roślinnej zarówno merystematycznej, jak i dojrzałej (z wyjątkiem martwych elementów ksylemu). Przepływ substancji między żywymi elementami komórek można podzielić na krótkodystansowy (dzięki połączeniu protoplastów sąsiednich komórek plazmodesmami) oraz długodystansowy (poprzez wyspecjalizowane ciągi elementów sitowych we floemie).

Transport symplastowy pomiędzy sąsiadującymi ze sobą komórkami może zachodzić przez plazmodesmy w drodze dyfuzji, czyli biernie. Przepływ taki jest wolniejszy aż o dwa rzędy wielkości od dyfuzji substancji w czystej wodzie; np. dla karboksyfluoresceiny szybkość transportu przez kanały cytoplazmatyczne wynosi $5,4 \times 10^{-8} \pm 1,5 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [5, 84], a szybkość dyfuzji w czystej wodzie to $4,5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [87]. Jednak porównując go z przepływem substancji przez błonę komórkową, okaże się on z kolei szybszy o dwa rzędy wielkości, czego przykładem jest transport strumienia asymilatów: kolejno $2,2 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2}$ ściany komórkowej $\cdot \text{s}^{-1}$ dla przepływu przez plazmodesmy [90] i $5,5 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2}$ ściany komórkowej $\cdot \text{s}^{-1}$ dla przepływu przez błony [65, 90]. Oznacza to, że transport symplastowy pomiędzy komórkami jest zdecydowanie szybszy i wydajniejszy niż przepływ przez błony komórkowe. Już dawno odkryto, iż przez plazmodesmy zachodzi przepływ substancji niskocząsteczkowych, takich jak: woda, cukry, niektóre jony, małe związki sygnałowe, czy też niektóre makromolekuły [14]. Choć należy pamiętać, iż z transportu symplastowego wyłączone są cząstki hydrofobowe i ujemnie naładowane. Doświadczenia pokazują, że droga plazmodesmalna jest zamknięta dla niektórych hormonów roślinnych, takich jak np. IAA (kwas indoliloctowy) i aminokwasów [85]. Jednak inne hormony, czego przykładem mogą być gibereliny, bez trudu przemieszczają się przez plazmodesmy [46].

2.1. Znaczenie komunikacji symplastowej w regulacji różnicowania komórek

Badania ostatnich lat pokazały, iż ograniczenie bądź zahamowanie komunikacji symplastowej może mieć kluczowe znaczenie w procesach różnicowania komórek, które wymagają włączenia indywidualnego programu rozwojowego. Doświadczalnie wykazano, że przez plazmodesmy możliwy jest transport związków wielkocząsteczkowych: białek i RNA – zarówno wirusowego, jak i endogennego mRNA czy RNA wyciszającego geny [17, 32, 54, 61, 71]. Oznacza to możliwość przepływu informacji genetycznej w formie mRNA bądź białek pomiędzy komórkami połączonymi plazmodesmami, a także przepływu RNAi (RNA interferencyjnego), czyli cząsteczek



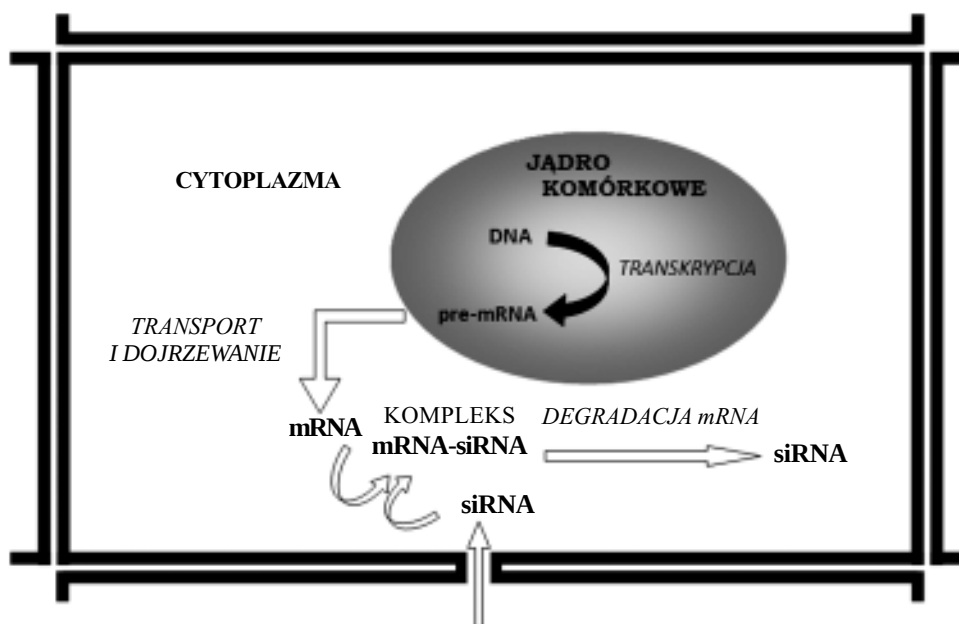
RYCINA 1. Rozmieszczenie mRNA (po lewej stronie) i powstałych z niego białek (po prawej stronie) w wierzchołku pędu. Zamalowano obszary, w których stwierdzono obecność mRNA i odpowiadającego mu białka. Intensywność zabarwienia na poszczególnych ilustracjach odpowiada gradientowi występowania białka w komórkach wierzchołka: L1, L2 – kolejne warstwy tuniki; L3 – pierwsza warstwa komórek korpusu [wg 20, 29, 41, 66, 72]

FIGURE 1. Diagrammatic representation of the expression pattern of various transcription factors in apical and floral meristems. Relative quantities of RNA and protein are represented by gradations of colour [acc. to 20, 29, 41, 66, 72]

RNA mogących po transkrypcji przemieszczać się symplastem i wyłączać określone geny w komórkach docelowych (patrz dalej).

Pierwsze doniesienia o możliwości przemieszczania się białek przez plazmodesmy (białko KNOTTED1 – KN1) pochodzą z obserwacji merystemów apikalnych kukurydzy (ryc.1). Białko KN1, odpowiedzialne za utrzymanie merystematycznego stanu komórek wierzchołka przechodzi z korpusu do tuniki [41]. Dowodem na to, iż białko może przemieszczać się kanałami cytoplazmatycznymi, są wyniki pokazujące obecność mRNA KN1 tylko w warstwie komórek L2 tuniki. Natomiast białko KN1 jest wykrywane zarówno w warstwie L2, jak i L1 (ryc.1). Dalsze badania wykazały, że transport taki jest zjawiskiem rozpowszechnionym i dotyczy wielu rodzajów białek syntetyzowanych w obrębie merystemu, między innymi DEFICIENS [66], CLAVATA3 [20] czy LEAFY [72]. Jednak trzeba zauważyć, iż przepływ przez plazmodesmy nie dotyczy wszystkich białek transkrybowanych w komórkach wierzchołka pędu. Przykładem może być APETALA3, dla którego wzory występowania mRNA i dojrzałego białka w komórkach merystemu są identyczne (ryc. 1) [29]. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że transport białek i RNA może zachodzić w różnych kierunkach, pomiędzy wszystkimi warstwami wierzchołka. Jednak kierunek nie jest przypadkowy, a precyzyjnie określony, co dobrze widać na przykładzie CLAVATA3; białko to przemieszcza się tylko do niektórych komórek w poszczególnych warstwach wierzchołka (ryc.1) [20]. O samym mechanizmie przepływu związków wielkocząsteczkowych wiemy coraz więcej (dokładny opis w [58]), jednak rozpatrując znaczenie tego zjawiska w procesie różnicowania komórki ważniejszy jest jego skutek. Białka pełnią w komórce funkcje budulcowe, regulacyjne i enzymatyczne. Informacja zapisana w DNA decyduje o losach komórki, ale decyduje właśnie poprzez białka i ich potranslacyjną obróbkę. Dlatego możliwość przemieszczania się mRNA i/lub białek bądź brak tej możliwości (poprzez zamknięcie plazmodesm) ma znaczenie w regulacji różnicowania komórek.

Symplastem mogą przemieszczać się również cząsteczki RNA wyciszające geny, czyli wspomniane wcześniej interferencyjne RNA (ryc. 2). Od momentu pierwszego opisu mechanizmu interferencji RNA [18] coraz więcej wiadomo o znaczeniu tego zjawiska w funkcjonowaniu komórek i powszechności jego występowania (m.in. [57, 81, 93]). Potwierdzono, że zarówno siRNA [31], jak i miRNA [50, 51] biorą udział w procesie potranskrypcyjnego wyciszania genów. Polega on na tym, iż małe cząsteczki kwasu rybonukleinowego (siRNA, miRNA) mają zdolność przyłączania się do fragmentów mRNA na terenie cytoplazmy, a następnie ich degradowania (ryc. 2). Oznacza to, iż nawet poprawnie odczytany zapis z DNA i przekazany na mRNA, może zostać usunięty z cytoplazmy komórki. Co najważniejsze, informacja ta zostaje usunięta przez działanie RNAi, które może pochodzić z komórek sąsiednich i jest transportowane do komórki docelowej przez plazmodesmy. Ponadto, ponieważ proces przekazywania informacji z DNA na białka jest wieloetapowy, jego regulacja także może zachodzić na wielu poziomach. Dowodem na to może być odkryty niedawno mechanizm wyciszania samego procesu transkrypcji, przez zmianę struktury chromatyny, przy udziale siRNA na terenie jądra [31]. Zapewne najbliższe lata przyniosą kolejne doniesienia o wpływie RNAi na regulację ekspresji genów.



RYCINA 2. Schemat pokazujący potranskrypcyjne wyciszanie genu, poprzez cząsteczkę miRNA pochodzącą z komórki sąsiedniej, która przedostała się do komórki docelowej poprzez plazmodesmę [wg 30, 31, 38, 90]

FIGURE 2. Scheme showing post-transcriptional gene silencing [acc. to 30, 31, 38, 90]

Opisane wcześniej informacje pokazują, iż drogi transportu symplastowego mogą pełnić funkcję magistrali informacyjnych, zapewniających przepływ podstawowych regulatorów procesów życiowych komórki.

3. DYNAMIKA PLAZMODESM

Granica przepuszczalności plazmodesm określana terminem SEL (ang. *Size Exclusion Limit*) oznacza masę cząsteczki podawaną w daltonach (Da), która może jeszcze przejść przez plazmodesmę na zasadzie dyfuzji [25]. Jednakże nie ma ścisłej zależności między masą i średnicą cząsteczki. Cząsteczka o większej masie, w porównaniu z cząsteczką o masie mniejszej, może być słabiej rozgałęziona, a co za tym idzie może ona przechodzić przez plazmodesmę o danej średnicy mikrokanału, w przeciwieństwie do cząsteczki o mniejszej masie cząsteczkowej, ale większej średnicy (tab.1) [24, 43]. Dlatego stosuje się jeszcze inny sposób określenia przepuszczalności plazmodesm, tak zwany MEL (ang. *Molecular Exclusion Limit*), czyli średnicę kanału podawaną w nanometrach (nm), która bardziej precyzyjnie określa granice przepuszczalności plazmodesm. Znając SEL lub MEL plazmodesmy, możemy teoretycznie ustalić, czy analizowane substancje są w stanie przemieścić

TABELA 1. Masa cząsteczkowa i średnica cząsteczki na przykładzie wybranych fluorochromów wykorzystywanych w badaniu transportu symplastowego oraz GFP i dekstranu [wg 3, 24 43]

TABLE 1. Molecular weight and molecule diameter of molecules on the example of some fluorochromes, GFP and dextran [acc. to 3, 24, 43]

Nazwa związku Chemicals	Masa cząsteczki Molecular weight [Da]	Średnica cząsteczki Molecule diameter [nm]
5-(i 6)-karboksy-fluoresceina (CFDA)	460,39	1,3
Sól sodowa kwasu 8-hydroksypireno-1,3,6-trójsulfonowego (HPTS)	524,39	0,9
Zielone białko fluorescencji (GFP)	27 000	2,8
Dekstran	10 000	2,3

się przez plazmodesmę w drodze dyfuzji, biorąc pod uwagę ich masę (SEL) bądź średnicę cząstki w jej najszerszym miejscu (MEL).

Przez izolację symplastową należy rozumieć ograniczenie lub zupełne zahamowanie transportu przez plazmodesmy. Może ona zachodzić na trzy sposoby: fizyczne ograniczenie liczby plazmodesm bądź zupełny ich brak, jak to jest w przypadku komórek szparkowych [1, 6, 91, 92], zmniejszenie średnicy plazmodesmy czy też zaczopowanie jej światła.

Ograniczanie MEL możliwe jest m.in. dzięki tworzeniu zwieraczy, które zmniejszają średnicę kanału cytoplazmatycznego. Badania z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej wykazały ich białkopodobny charakter [2, 60]. Jednym z białek zwieracza

jest syntaza 1,3- β -D-glikanu. Synteza 1,3- β -D-glikanu może prowadzić, poprzez stopniowe zwężanie światła plazmodesmy, do jej zamknięcia. Syntaza 1,3- β -D-glikanu jest integralnym białkiem błonowym, a jej produkt – kaloza jest kumulowana pomiędzy ścianą komórkową a plazmolemmą [52, 60]. Sugeruje to, że poprzez regulację aktywności enzymu syntazy, komórka może bardzo precyzyjnie zmniejszać średnicę plazmodesmy, a co za tym idzie jej MEL, w sytuacji skrajnej prowadząc do całkowitego wstrzymania transportu symplastowego. Oprócz zwieraczy, opisano inny system zamykania plazmodesm, poprzez tak zwane „czopy” białkopodobnych substancji znajdujących się w ich kanale. Obserwowano bowiem komórki nieoddzielone zwieraczami, jednak LYCH (ang. *Lucifer Yellow CH*, fluorochrom transportu symplastowego) podany do nich nie przemieszczał się do komórek sąsiednich [69]. Wśród białkopodobnych substancji blokujących światło plazmodesmy wykazano obecność 1,3- β -D-glikanu [69]. Zjawisko odwracalnego czopowania plazmodesm zostało opisane w trakcie spermatogenezy u *Chara vulgaris* [45, 47, 48]. Należy przyjąć, iż tworzenie pierścienia zwieracza i czopowanie kanału zachodzi niezależnie od siebie. Co nie zmienia faktu, że powstanie zwieracza umożliwia precyzyjną regulację MEL, natomiast czopowanie szczelnie zamyka cały kanał plazmodesmy [45, 69].

Plazmodesmy są strukturami bardzo wrażliwymi na zmieniające się warunki środowiska otaczającego i wewnętrznego. Nawet na niewielkie zmiany środowiska komórka reaguje syntezą kalozy i jej odłożeniem w świetle plazmodesmy, przez co następuje zwężenie światła kanału cytoplazmatycznego, a następnie jego zamknięcie [69]. Na zmniejszenie SEL/MEL może mieć wpływ stężenie jonów Ca^{2+} [3, 15, 86], zmiany turgoru komórek [62], a nawet warunki hodowli roślin [94]. Każde zranienie [70] czy też wnikięcie patogenów, np. wirusów [7] do organizmu rośliny wywołuje

szybką odpowiedź w postaci syntezy kalozy, aby odizolować zarażoną bądź uszkodzoną komórkę od zdrowych komórek sąsiednich. Wykazano, że synteza kalozy rozpoczyna się już po 5 minutach od zranienia rośliny [21]. Natomiast w odpowiedzi na zmiany stężenia jonów wapnia, synteza 1,3- β -D-glikanu następuje znacznie szybciej, w czasie od 10 do 30 sekund [83]. Oznacza to, że rośliny mają mechanizm, którego uruchomienie umożliwi błyskawiczne izolowanie komórek od otoczenia. Hydroliza kalozy (i przywrócenie łączności symplastowej) możliwa jest dzięki działalności enzymu 1,3- β -D-glukanazy [69], który także zależny jest od stężenia jonów wapnia wewnątrz komórki [83]. Czas potrzebny na rozkład kalozy może być równie krótki jak czas jej syntezy i wynosi około 90 sekund [83]. Przypuszcza się, że tak szybkie odpowiedzi komórki, jeśli chodzi o syntezę i rozkład kalozy, są możliwe dzięki działalności kinazy IP3 (kinaza 3-fosfatydyloinozytolu) wpływającej na otwarcie bądź zamknięcie kanałów wapniowych, a co za tym idzie zmiany poziomu Ca^{2+} w cytoplazmie [80, 83].

4. ZNACZENIE IZOLACJI SYMPLASTOWEJ W PROCESIE RÓŻNICOWANIA KOMÓREK

W trakcie rozwoju oraz w dojrzałej roślinie pojawiają się pojedyncze komórki, bądź całe ich zespoły, które są symplastowo izolowane od otoczenia. Ograniczenie komunikacji między komórkami jest często spotykane zarówno w tkankach merystematycznych, takich jak merystem apikalny pędu [68, 69], ale także w komórkach już zróżnicowanych, czego przykładem może być aparat szparkowy [16, 63], czy komórki epidermy strefy włosnikowej korzenia [13]. Obszary takie nazywamy domenami lub polami symplastowymi, i o ile na ich granicy występują ograniczenia w połączeniu protoplastów, o tyle wewnątrz tych obszarów drożne plazmodesmy zapewniają łączność między komórkami. Oznacza to, że pola symplastowe i domeny tworzą grupy komórek, które mogą być w organizmie odrębnymi jednostkami tak rozwojowymi, jak i funkcjonalnymi [23].

Definicje domeny i pola symplastowego zostały przedstawione w poprzednich pracach [43, 74], tu przypominamy tylko, że przez domenę symplastową należy rozumieć izolowaną od otoczenia grupę połączonych ze sobą komórek obecnych w tkance już dojrzałej. Przykładem domeny może być aparat szparkowy w liściach *Comemelina* i *Allium* [63], komórki epidermy korzenia *Arabidopsis thaliana* [13], zarodek rzodkiewnika (do pewnego etapu rozwoju) [34, 35, 36, 43, 44, 78] czy też dojrzały woreczek zalążkowy *Torenia fournieri* [12, 22]. Natomiast pole symplastowe to obszar komórek w tkankach merystematycznych, który jest izolowany symplastowo od otoczenia. W odróżnieniu od domen, w obrębie pola symplastowego występują ciągle zmiany układów komórkowych, które są związane z proliferacją komórek [68]. Przykładem występowania takiej izolacji symplastowej jest merystem apikalny roślin okrytonasiennych. Doświadczalnie wykazano, iż na styku warstwy zewnętrznej komórek (tuniki) i warstw położonych głębiej (korpusu) występuje

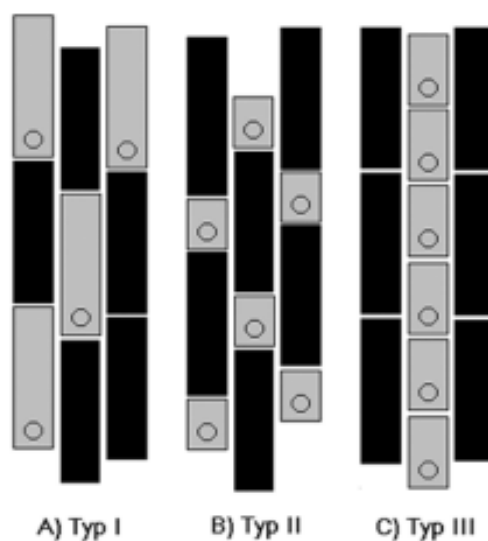
wyraźna granica dla komunikacji symplastowej. Dodatkowo także, w obrębie samej tuniki można zaobserwować izolację symplastową obszaru centralnego i części proksymalnej [68, 69, 73].

Najlepiej poznane do tej pory przykłady różnicowania komórek, w których izolacja symplastowa odgrywa istotną rolę, szczegółowo opisano poniżej.

4.1. Izolacja symplastowa w różnicowaniu komórki włosnikowej

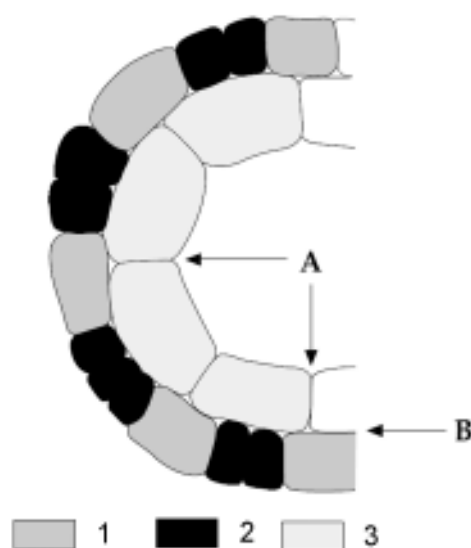
Włosniki to wytwory komórek epidermy korzenia, które zwiększają jego powierzchnię chłonną, umożliwiając lepsze umocowanie korzenia w glebie, a także są miejscem nawiązywania interakcji z mikroorganizmami. O ile każda z komórek epidermy wchodząc w strefę różnicowania może wykształcić wypustkę włosnikową, to tylko niektóre z nich wytworzą włosniki. Badania ostatnich lat pozwoliły na dokładne poznanie każdego z etapów tworzenia włosników u modelowej *Arabidopsis thaliana*, wraz z genami i ich białkowymi produktami charakterystycznymi dla tego procesu [4, 28, 49, 67]. Dodatkowo prowadzone były badania nad białkami, mającymi charakter enzymatyczny, transportowanymi symplastowo między komórkami ryzodermy [71, 89], które w połączeniu ze studiami prowadzonymi nad izolacją symplastową w różnicującej się epidermie korzenia [13] dają pełen obraz procesu specjalizacji trichoblastów i atrichoblastów. Mogą także być modelem w rozważaniu znaczenia czynnika izolacji symplastowej w różnicowaniu komórki.

W epidermie korzenia (ryzodermie) roślin okrytonasiennych możemy wyróżnić dwa rodzaje komórek: trichoblasty wytwarzające wypustkę włosnikową oraz atrichoblasty, które włosników nie produkują. Te dwa rodzaje komórek tworzą specyficzny wzór epidermy związany z rozmieszczeniem włosników. Wyznaczono trzy modele układu komórek epidermy (ryc. 3). W modelu I każda z komórek ma zdolność do wytworzenia włosnika, w modelu II komórki w strefie różnicowania przechodzą asymetryczny podział i tylko mniejsza z potomnych różnicuje się w komórkę włosnikową, natomiast w modelu III komórki włosnikowe są ułożone w pionowe rzędy przedzielone jednym bądź kilkoma pionowymi rzędami atrichoblastów [9, 11].



RYCINA 3. Modele rozmieszczenia trichoblastów i atrichoblastów w ryzodermie. Komórki zaznaczone czarnym kolorem odpowiadają atrichoblastom, zaś komórki zaznaczone kolorem szarym odpowiadają trichoblastom (za [40], zmienione)

FIGURE 3. Three types of root epidermal patterning in mature root of vascular plants. Black cells are non-hair cells and gray cells are root hair cells (acc. to [40], changed)



RYCINA 4. Schemat przekroju poprzecznego przez korzeń *Arabidopsis thaliana* pokazujący układ komórek epidermy nad komórkami kory (za [11], zmienione): 1 – komórki włosnikowe (trichoblasty), 2 – komórki bezwłosnikowe (atrichoblasty), 3 – komórki kory; A – antyklinalne ściany komórkowe, B – peryklinalne ściany komórkowe

FIGURE 4. Organization of cells and tissues in the *Arabidopsis* root on the cross section (acc. to [11], changed): 1 – hair cells (trichoblasts), 2 – non-hair cells (atrichoblasts), 3 – cortex cells; A – anticlinal cell walls, B – periclinal cell walls

U *Arabidopsis* występuje III typ (model) wzoru epidermalnego (ryc. 3), a wspomniane wcześniej ciągi komórek włosnikowych leżą nad ścianami antyklinalnymi komórek kory korzenia (ryc. 4). Pomiędzy pionowymi rzędami trichoblastów znajdują się jeden lub dwa pionowe rzędy atrichoblastów, leżące nad peryklinalnymi ścianami komórek kory [10]. Czy to zatem informacja pozycyjna determinuje drogę specjalizacji komórki epidermy, czy też inne czynniki okazują się decydujące?

Analizując mechanizmy różnicowania komórek włosnikowych i procesy zachodzące w atrichoblastach oraz śledząc produkty genów odpowiedzialnych za ten proces odkryto, iż część białkowych produktów przemieszcza się symplastowo przez plazmodesmy determinując losy komórek. Już w 1994 roku wykazano, że w trakcie rozwoju epidermy korzenia pomiędzy sąsiadującymi komórkami muszą przemieszczać się czynniki transkrypcyjne decydujące o losach komórek [40]. Nazwano je HCIF (ang. *Hair Cell Inducing Factor*, czyli czynnik indukujący powstawanie komórki włosnikowej) oraz HCSF (ang. *Hair Cell Suppressor Factor*, czyli czynnik hamujący rozwój komórki włosnikowej) [40]. Wynikiem ich działania w komórce docelowej miało być aktywowanie (poprzez HCSF) lub wyłączanie (poprzez HCIF) genów *GL2* (*GLABRA2*) i *TTG* (*TRANSPARENT TESTA GLABRA*). Założenie to oparto na wynikach obserwacji mutantów *gl2* i *ttg*, u których komórki włosnikowe rozwijały się niezależnie od położenia nad ścianami antyklinalnymi komórek kory.

Dzisiaj wiemy, że jednym z najważniejszych genów decydujących o losach komórki ryzodermy jest gen *GLABRA2* (*GL2*). Jego znaczenie jest tak ważne, ponieważ jest on odpowiedzialny za negatywną regulację fosfolipazy D ζ 1, która z kolei jest czynnikiem transdukcji sygnałów biorących udział w indukowaniu różnicowania trichoblastów [59]. Oznacza to, że w momencie mutacji *GL2* negatywna regulacja D ζ 1 zostanie zaburzona, a co za tym idzie, komórki epidermy nie będą się różnicowały w trichoblasty. Jednocześnie o znaczeniu genu *GL2* w procesie różnicowania komórek włosnikowych może świadczyć to, że on także jest

kontrolowany przez całą grupę czynników transkrypcyjnych, spośród których można wyróżnić białka typu MYB (odgrywające kluczową rolę w kontroli wzrostu i różnicowania komórek), które są kodowane m.in. przez geny *CAPRICE* (*CPC*) i *WEREWOLF* (*WER*) [49, 88]. Doświadczalnie wykazano, iż mutacje w *CPC* powodują powstanie roślin bezwłosnikowych [37]. Oznacza to, że *CPC* jest pozytywnym regulatorem różnicowania komórek włosnikowych. Jednocześnie działa on jako represor *GL2*, o czym może świadczyć brak domeny aktywującej w *CPC* [37]. Zgodnie w powyższymi informacjami oczywiste wydaje się, że akumulacja mRNA genu *CPC* będzie występowała w jądrze atrichoblastów. Jednak badania z wykorzystaniem GFP (ang. *Green Fluorescent Protein*, białko zielonej fluorescencji) połączonego z białkiem CPC, wykazały obecność CPC we wszystkich komórkach ryzodermy [89]. Wyjaśnieniem tego zjawiska może być tylko symplastowy transport fuzyjnego białka poprzez plazmodesmy między komórkami.

Innymi czynnikami transkrypcyjnymi negatywnie regulującymi specjalizację komórek włosnikowych są *GLABRA3* (*GL3*) i *ENHANCER OF GLABRA3* (*EGL3*), a ich mutacje powodują zmniejszenie liczby lub zupełny brak atrichoblastów (u mutantów *gl3gl3*) [4]. Jednak badania prowadzone 2 lata po odkryciu funkcji tych genów wykazały, iż są one transkrybowane w komórkach włosnikowych [42], natomiast obecność białka GL3 obserwowana była w jądrach komórek niewłosnikowych. Oznacza to, iż mamy do czynienia, tak jak to było w wypadku białka CPC, z przemieszczaniem się GL3 pomiędzy protoplastami komórek za pośrednictwem plazmodesm.

Omawiane powyżej prace, pokazujące genetyczne podstawy inicjowania rozwoju włosnika wskazują, że w tym skomplikowanym procesie dużą rolę odgrywa transport symplastowy, regulujący przepływ produktów genów istotnych dla procesu różnicowania komórek ryzodermy. Natomiast występowanie zjawiska izolacji symplastowej w ryzodermie, zostało wykazane przy zastosowaniu fluorochromów: mikroiniekcji LYCH oraz nieinwazyjnego podania karboksylfluoresceiny [13]. Komórki ryzodermy znajdujące się blisko wierzchołka korzenia, poniżej strefy różnicowania, zachowują połączenia symplastowe, co wykazała analiza przemieszczania się wspomnianych wyżej fluorochromów. Jednak najszybsze rozprzestrzenianie się fluorochromów obserwowano pomiędzy komórkami tego samego typu, do którego fluorochrom został podany. To sugeruje, iż pomiędzy komórkami, które w wyniku pierwszego podziału zostały już predysponowane do realizowania określonej drogi rozwojowej [8, 11], plazmodesmy przez swoją liczbę i średnicę zapewniają sprawniejszą komunikację symplastową [13]. W tych samych badaniach sprawdzono, jak wygląda model komunikacji symplastowej w strefie różnicowania korzenia, gdzie następuje realizacja opisanych wcześniej programów genetycznych. Dzięki zastosowaniu precyzyjnych metod podawania fluorochromów do pojedynczej komórki możliwe było zbadanie stopnia ich komunikacji z otoczeniem [13]. Zarówno przy podaniu fluorochromu do cytoplazmy trichoblastu, jak i atrichoblastu, w ponad 94% przypadków nie obserwowano żadnego przepływu znacznika do komórek sąsiednich, to znaczy z atrichoblastów do trichoblastów i odwrotnie. Jednoznacznie wskazuje to, iż w momencie rozpoczęcia różnicowania, komórki epidermy korzenia – trichoblasty i atrichoblasty, stają się domenami symplastowymi izolowanymi od otoczenia [13]. Wyniki te

potwierdzają jak istotna jest kontrola komunikacji symplastowej i jak ważna jest czasowa korelacja między pojawianiem się izolacji symplastowej a różnicowaniem komórek.

4.2. Znaczenie izolacji symplastowej w procesie różnicowania woreczka zalążkowego *Torenia fournieri*

Doświadczenia nad komunikacją protoplastów komórek woreczka zalążkowego były prowadzone przy zastosowaniu mikroiniekcji fluorochromu LYCH, a także dekstranów o różnych masach cząsteczkowych (3, 10 i 40 kDa). Dzięki temu możliwe było śledzenie nie tylko obecności czy braku połączeń symplastowych, ale także stopnia przepuszczalności plazmodesm dla substancji o określonej wielkości cząsteczki [22]. Badania przeprowadzono na *Torenia fournieri* i obejmowały: młody zalążek zaraz po zakończeniu przezeń podziałów, dojrzwały – gdy możliwe było już jego zapłodnienie, a także zmiany zachodzące po zapyleniu i podwójnym zapłodnieniu [12, 22]. Fluorochrom i dekstrany były wprowadzane do komórki centralnej, a następnie analizowano ich przemieszczanie się. U *Torenia fournieri*, jako typowego przedstawiciela roślin okrytozalążkowych, można wyróżnić w dojrzłym woreczku zalążkowym siedem komórek: dwie synergidy, jedną komórkę jajową, jedną komórkę centralną i trzy antypody. Jednak charakterystyczne dla tego gatunku jest to, iż woreczek zalążkowy nie jest otoczony żadnymi tkankami somatycznymi [82]. Woreczek zalążkowy wyrasta poza mikropylarną część zalążka, i niczym nieosłonięty styka się bezpośrednio z łożyskiem [26, 82]. W części nieosłoniętej przez tkanki rośliny macierzystej znajdują się synergidy, komórka jajowa oraz prawie połowa komórki centralnej [26]. Właśnie z powodu możliwości łatwego obserwowania zmian w komunikacji symplastowej pomiędzy komórką jajową, synergidami i komórką centralną obiekt ten został wybrany do badań [22].

W młodym zalążku obserwowano swobodny ruch dekstranów o masie 3 i 10 kDa z komórki centralnej do komórki jajowej i synergid. Różnice dotyczyły jedynie czasu potrzebnego na przepływ tych znaczników. W wypadku dekstranu o masie 3 kDa fluorescencję w synergidach i komórce jajowej obserwowano po 5 minutach. Natomiast przy zastosowaniu dekstranów o masie 10 kDa, czas potrzebny na ich przedostanie się do aparatu jajowego wynosił 30 minut [22]. Nawet przy przedłużonych czasach obserwacji nie wykazano jakiegokolwiek ruchu znaczników o masie 40 kDa pomiędzy analizowanymi komórkami.

W zalążku dojrzłym (czyli takim, którego możliwe jest zapłodnienie) swobodny ruch między komórkami możliwy był tylko dla dekstranów o masie 3 kDa. Substancje o większej masie cząsteczkowej (10 kDa) przemieszczały się między komórką centralną a jajową i synergidami tylko w 41% wypadków (14 z 34 badanych). Natomiast w 2 dni po osiągnięciu dojrzałości przez woreczek nie obserwowano żadnego ruchu znaczników o masie 10 kDa, a przepływ dekstranów o masie 3 kDa występował tylko w 51% prób (16 z 31 badanych) [22]. Z powodu tego spadku komunikacji symplastowej dalsze badania przemian w woreczku zalążkowym oparto na mikroiniekcji LYCH, którego masa cząsteczkowa wynosi 521 Da. U *Torenia four-*

neri od zapylenia do zapłodnienia mija 9 godzin i przez cały ten czas nie stwierdzono żadnych zmian w komunikacji symplastowej w porównaniu z dojrzałym woreczkiem zalążkowym – następował swobodny przepływ LYCH z komórki centralnej do komórki jajowej [22]. Po 24 godzinach od podwójnego zapłodnienia tylko w 55% przypadków (u 12 z 22 zalążków) żółcień lucyferowa przedostawała się z bielma pierwotnego do zygoty powstałej z zapłodnionej komórki jajowej [22]. Wskazuje to na gwałtowny spadek łączności pomiędzy protoplastami. Zastosowanie znacznika o najmniejszej masie cząsteczkowej (ze wszystkich użytych), pokazuje, iż po zapłodnieniu następuje istotne ograniczenie SEL plazmodesm. Szczególnie w porównaniu z dojrzałym woreczkiem zalążkowym (który pozwalał na przepływ dekstranów nawet o masie 10 kDa).

Warto zauważyć, że opisane powyżej badania wykazały, że między komórkami gametofitu żeńskiego istnieje pełna komunikacja, a SEL plazmodesm jest wyjątkowo duża, pozwalająca na przemieszczanie się cząsteczek o masie 10 kDa oraz że transport ten jest wyjątkowo intensywny. Pojawienie się izolacji symplastowej między zygota a endospermą oznacza zsynchronizowanie zmniejszania SEL plazmodesm z powstaniem nowego sporofitu. Taki wynik oznacza nie tylko izolację między różnymi genotypami, ale także między kolejnymi pokoleniami.

Doświadczenia te wyraźnie wskazują, że komunikacja symplastowa, istniejąca dzięki występowaniu plazmodesm, ma za zadanie m.in. koordynowanie rozwoju komórek położonych blisko siebie. W momencie, gdy ich rozwój musi przebiegać równocześnie, jak było to w przypadku przygotowywania się komórki jajowej i centralnej do jednoczesnego zapłodnienia, istniała konieczność wystąpienia między nimi łączności symplastowej. Jednak w czasie, gdy komórki te są przygotowywane do pełnienia różnych funkcji, wymagane jest ograniczenie ich komunikacji symplastowej przez zmniejszenie wartości SEL łączących je plazmodesm.

4.3. Izolacja symplastowa w trakcie rozwoju nasiona *Arabidopsis thaliana*

Po procesie zapłodnienia woreczek zalążkowy przekształca się w nasiono otoczone łupiną nasienną i zawierające rozwijający się zarodek. W badaniach nad łącznością symplastową komórek w obrębie nasion wykorzystano białko GFP, które było transkrybowane pod promotorami różnych genów, m.in. *AtSUC2* czy *AtGL2* [77]. Gen *AtSUC2* koduje transporter sacharozy [76], który odpowiada za transport tego cukru z komórek towarzyszących do elementów sitowych w ciągach floemowych. Transport floemowy asymilatów w roślinie przebiega w kierunku od źródeł, gdzie zachodzi fotosynteza, do tkanek i organów zlewni (akceptorów) wykorzystujących substancje odżywcze. To właśnie tu następuje rozładunek floemu i późniejszy postfloemowy transport asymilatów między komórkami. Oba te procesy możliwe są dzięki występowaniu plazmodesm i zachodzą drogą symplastową [19, 27, 64, 77], chociaż pojawiły się pierwsze doniesienia o zaangażowaniu apoplastu w mechanizmy rozładunku floemu [95]. Poszczególne organy zlewni rywalizują ze sobą o strumień asymilatów, a na ich typ, liczbę i rozmiar wpływają: stan rozwojowy rośliny i warunki środowiska [79]. Jednym z najsilniejszych akceptorów jest rozwijające się nasiono,

ponieważ jego prawidłowe wykształcenie jest niezbędne do zachowania ciągłości gatunku. Dlatego u roślin w trakcie wykształcania i dojrzewania nasion, białko GFP pod promotorem genu *AtSUC2*, może być użyte do bezinwazyjnego badania komunikacji symplastowej pomiędzy rozwijającym się nasionem a rośliną. Nasiono *Arabidopsis* otoczone jest łupiną nasienną składającą się z dwóch osłonek. Badania przy użyciu GFP wykazały, iż zewnętrzna osłonka łupiny nasiennej pozwala na rozładunek floemu, dzięki występowaniu drożnych połączeń plazmodesmowych [78]. Oznacza to, że zewnętrzna osłonka jest przedłużeniem symplastu floemowego suspensora, a między warstwami komórek zewnętrznej części łupiny może zachodzić przepływ białek o masie powyżej 27 kDa (GFP), ale mniejszej niż 47 kDa (GFP połączone ze sporaminą). Jednak dokładne analizy w mikroskopie konfokalnym na nasionach z zarodkami w stadium torpedy, wykazały brak przemieszczania się GFP z osłonki zewnętrznej do komórek osłonki wewnętrznej. Natomiast zarodek znajdujący się w stadium globularnym utrzymywał z suspensorem częściową ciągłość symplastową wykazaną przez obecność, w zarodkowym obszarze rozładunku floemu, fluorescencji GFP transkrybowanego pod promotorem genu *AtSUC2* [77]. Dalsze doświadczenia z użyciem GFP pod promotorem genu *TRANSPARENT TESTA 12* (*AtTT12*), którego ekspresja występowała tylko w najgłębszej warstwie komórek łupiny, ujawniły występowanie komunikacji symplastowej między komórkami tylko w obrębie wewnętrznej osłonki. Aby sprawdzić łączność symplastową pomiędzy zewnętrzną i wewnętrzną osłonką zastosowano niskocząsteczkowy fluorochrom HPTS, który podany do floemu przedostawał się tylko do zewnętrznej warstwy łupiny. Jednoznacznie wskazuje to, iż wewnętrzna osłonka jest izolowana symplastowo, tak od zewnętrznej warstwy łupiny nasiennej, jak i od leżącej pod nią endospermy. Z kolei dalsze badania ruchu znaczników obecnych w zarodku wykazały jego izolowanie od endospermy [77]. Wyniki tych doświadczeń wyraźnie wskazują aż 3 granice transportu symplastowego: pomiędzy zewnętrzną i wewnętrzną warstwą łupiny nasiennej, pomiędzy wewnętrzną warstwą łupiny a zarodkiem oraz pomiędzy floemem suspensora a zarodkiem. Daje to gwarancję, iż żadna informacja, mogąca zaburzyć procesy embriogenezy, pochodząca z komórek rośliny macierzystej zawierających inną informację genetyczną i realizujących inny program rozwojowy, nie przedostanie się do zarodka. Natomiast sam transport substancji pokarmowych poprzez wspomniane granice może zachodzić poprzez specyficzne dla nich przenośniki, takie jak: *AtSUC3* (w komórkach suspensora i osłonek) [56] czy *AtSUC5* (występujący w endospermie) [56].

Oprócz wspomnianych wcześniej granic symplastowych pomiędzy rozwijającym się zarodkiem a rośliną macierzystą badania Stadler i współpracowników [77] wykazały, iż w trakcie dojrzewania nasion zaczynają się pojawiać ograniczenia komunikacji symplastowej również wewnątrz zarodka. Dane te zostały potwierdzone w innych doświadczeniach sprawdzających łączność symplastową w trakcie embriogenezy [34, 35, 36, 43].

Warto zaznaczyć, iż symplastowe izolowanie rozwijającego się zarodka od tkanek macierzystych jest również opisane dla procesu somatycznej embriogenezy [44]. W tym wypadku granice dla komunikacji symplastowej zbadano przy użyciu

fluorochromu CFDA (ang. *5-(and-6)-CarboxyFluorescein DiAcetate*, dwuocian karboksyfluoresceiny), który podany do tkanek eksplantatu nie przedostawał się do komórek zarodka. Wyniki te pokazują, iż proces symplastowego izolowania różnicujących się komórek od otoczenia jest mechanizmem uniwersalnym, występującym także w wypadku zaistnienia warunków sztucznych.

4.4. Znaczenie izolacji symplastowej w embriogenezie *Arabidopsis*

Zmiany w komunikacji symplastowej podczas embriogenezy *Arabidopsis thaliana* zostały już dokładnie opisane we wcześniejszych pracach [33, 34, 35, 36, 39, 43, 77]. Mówiąc o znaczeniu izolacji symplastowej w trakcie tego procesu warto zwrócić uwagę na pracę Kim i współpracowników z 2002 [33]. W doświadczeniach tych wykorzystano zarodki mutantów *isel* (ang. *Increased Size Exclusion limit of plasmodesmata*), które charakteryzują się brakiem spadku stopnia komunikacji symplastowej (średnica ich plazmodesm nie zmniejsza się) podczas wejścia w stadium torpedo. Próby wyhodowania siewki mutantu możliwe były tylko na podłożu agarowym z pożywką, jednak rośliny te były karłowate, bardzo wolno się rozwijały, a w ryzodermie każda komórka różnicowała się w trichoblast [33]. Przykład mutantu *isel* najlepiej wskazuje, iż wystąpienie izolacji symplastowej w odpowiednim stadium rozwojowym jest niezbędne, aby wszystkie mechanizmy regulacji genetycznej mogły prawidłowo pokierować procesem różnicowania komórek ryzodermy.

Także mutanty *ise2*, niewykazujące spadku łączności symplastowej w trakcie trwania stadium torpedo i charakteryzujące się nie tylko prostymi, ale także rozgałęzionymi plazmodesmami [39] wykazywały poważne zaburzenia rozwojowe. Dokładna analiza genetyczna i ultrastrukturalna wykazała, że ISE2 wpływa na strukturę i funkcję plazmodesm poprzez regulację metabolizmu RNA i w konsekwencji ekspresję genów [39].

5. PODSUMOWANIE

Komórka zachowująca łączność symplastową (to znaczy, że jej protoplast jest połączony z protoplastami komórek sąsiednich za pomocą kanałów cytoplazmatycznych – plazmodesm) przez cały czas odbiera różne sygnały, mogące modyfikować procesy w niej zachodzące. Hormony, czy też białka, produkowane w jednej komórce są transportowane przez plazmodesmy w drodze dyfuzji do komórek sąsiednich. Stąd możliwe jest koordynowanie wzrostu i rozwoju całych grup komórek czy też poszczególnych organów. Jednak w roślinie, która jest organizmem złożonym, konieczne jest występowanie i funkcjonowanie obok siebie komórek na różnych etapach rozwoju oraz pełniących odmienne funkcje. Specjalizacja komórek jest możliwa tylko w wypadku wystąpienia przynajmniej częściowej izolacji symplastowej. Dzięki temu następuje ograniczenie przemieszczania się do komórki z jej otoczenia informacji

wpływających na jej procesy transkrypcji i translacji, a także dopływu białek uczestniczących w procesach różnicowania.

Już wczesne badania wykazały u roślin obecność barier symplastowych. Erwee i Goodwin [16] opisują je u nasady liścia, w łodydze (pomiędzy epidermą a korą pierwotną międzywęzli), a także w korzeniu (między strefą czapeczki a innymi strefami rozwojowymi oraz między epidermą i korą pierwotną). Są to miejsca, w których następuje ograniczenie komunikacji symplastowej komórek, co związane jest z pełnieniem przez nie odmiennych funkcji bądź występowaniem różnych etapów rozwojowych (granica między czapeczką a pozostałymi strefami rozwojowymi korzenia). Dokładniejsze badania, z użyciem fluorochromów oraz białek fluorescencyjnych (w głównej mierze GFP), pozwoliły na scharakteryzowanie grup, czy też pojedynczych komórek, które są izolowane w tkankach merystematycznych (pola symplastowe), jak i tkankach dojrzałych (domeny symplastowe).

O tym jak wielkie znaczenie ma zahamowanie transportu symplastowego może świadczyć powszechność występowania tego zjawiska w organizmie rośliny oraz to, jak istotne procesy są od niego zależne. W wierzchołkach wzrostu konieczne jest rozdzielenie dwóch odmiennych procesów: podziałów komórek oraz ich wstępnego różnicowania.

W centrum merystemów apikalnych zachodzą szybkie podziały, dostarczające komórek niezbędnych do wzrostu rośliny, z kolei na obwodzie merystemu rozpoczynają się już procesy ich różnicowania [69, 73]. Pomiędzy tymi obszarami konieczne jest występowanie granicy dla przepływu symplastowego. Komórki części centralnej (przez plazmodesmy) swobodnie przekazują między sobą informacje, które pobudzają je do szybkich podziałów. Część z nich zostaje przesunięta poza obszar centralny, a część rozpoczyna krótki etap wzrostu i kolejny podział. Natomiast komórki przesunięte do obszaru peryferycznego rozpoczynają różnicowanie związane z pełnieniem przez nie przyszłych funkcji. Gdyby nie nastąpiło zahamowanie transportu symplastowego pomiędzy tymi grupami, nie byłaby możliwa specjalizacja komórek obszaru peryferycznego, ponieważ informacja niesiona w symplacie kierowałaby je na drogę dalszych podziałów. Opisana sytuacja ma miejsce w merystemach pędu, gdzie granica między polami symplastowymi może przebiegać w obrębie jednej warstwy komórek. Natomiast w korzeniu izolacja symplastowa występuje między komórkami znajdującymi się w merystemie i strefie wydłużania a komórkami znajdującymi się w strefie różnicowania [13], co wykazały między innymi badania z zastosowaniem GFP [78]. Co ważne, pojawianie się izolacji tych obszarów można obserwować już podczas embriogenezy [35].

Także w dojrzałych organach odcięcie komórek od transportu symplastowego jest często spotykane i niezbędne, by mogły one spełniać swoje funkcje. Tak jest w wypadku powstawania włosników korzenia [13], czy też rozwoju komórek aparatu szparkowego w epidermie liści [63]. W drugim przypadku zachowanie pełnej izolacji protoplastu komórki jest konieczne nie tylko na etapie różnicowania, ale przede wszystkim w trakcie jej funkcjonowania (aby aparat szparkowy mógł spełniać swoje funkcje związane z oddychaniem i transpiracją musi zostać zupełnie odcięty od komórek sąsiednich).

Innym przykładem, wskazującym na znaczenie zmniejszenia lub zahamowania transportu symplastowego, jest ograniczanie połączeń między komórkami we wczesnych etapach rozwoju rośliny. Przykładami mogą być: proces tworzenia woreczka zalążkowego [22], podwójne zapłodnienie [12], rozwój nasion [77] czy embriogeneza [34, 35, 36, 43; 44, 77].

Dzięki technikom badawczym z zastosowaniem fluorochromów i białek fluorescencyjnych stała się możliwa obserwacja nie tylko transportu symplastowego czy jego braku, ale także stopnia przepuszczalności plazmodesm, które są odpowiedzialne za połączenie protoplastów komórek leżących obok siebie. Wyniki tych doświadczeń określają, jakiej wielkości cząsteczki mogą być przenoszone między komórkami w danych tkankach, na ściśle określonych etapach rozwoju. Ma to niebagatelne znaczenie, ponieważ dostarcza informacji o tym, jakie substancje, mogące ingerować w różnicowanie się komórki, są w stanie przedostać się do jej wnętrza. Dlatego proces różnicowania komórek zależy od informacji niesionej przez transport symplastowy dotyczący całego organizmu, jak i przepływu krótkodystansowego, między sąsiednimi komórkami. Jak wykazano w pracy, procesy izolowania symplastowego u roślin są obecne zarówno w najwcześniejszych etapach rozwoju, podczas formowania młodego organizmu oraz w pełni już ukształtowanych organach.

LITERATURA

- [1] ALLAWAY WG, SETTERFIELD G. Ultrastructural observations on guard cells of *Vicia faba* and *Allium porrum*. *Can J Bot* 1972; **50**: 1405–1413.
- [2] BADEL T, WHITE RG, OVERALL RL, VESK M. Ultrastructural Specializations of the Cell Wall Sleeve Around Plasmodesmata. *Am J Bot* 1994; **81**: 1422–1427.
- [3] BARON-EPEL O, GHARYAL PK, SCHINDLER M. Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells. *Planta* 1988; **173**: 389–395.
- [4] BERNHARDT C, LEE MM, GONZALES A, ZHANG V, LLOYD A, SCHIEFELBEIN J. The gHLH genes *GLABRA3* (*GL3*) and *ENHANCER OF GLABRA3* (*EGL3*) specify epidermal cell fate in the *Arabidopsis* root. *Development* 2003; **130**: 6431–6439.
- [5] BRET-HARTE MS, SILK WK. Fluxes and deposition rates of solutes in growing roots of *Zea mays*. *J Exp Bot* 1994; **45**: 1733–1742.
- [6] CARR DJ. Plasmodesmata in growth and development. W: Gunning BES, Robards AW [red.] *Intercellular Communication in Plants: Studies on Plasmodesmata*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1976: 243–309.
- [7] CHOI CW. Modified plasmodesmata in *Sorghum* (*Sorghum bicolor* L. Moench) leaf tissues infected by maize dwarf mosaic virus. *J Plant Biol* 1999; **42**: 63–70.
- [8] CORMACK RG. A comparative study of developing epidermal cell in white mustard and tomato roots. *Am J Bot* 1947; **34**: 310–314.
- [9] DOLAN L. Pattern in the root epidermis: an interplay of diffusible signals and cellular geometry. *Ann Bot* 1996; **77**: 547–553.
- [10] DOLAN L, DUCKETT CM, GRIERSON C, LINSTED P, SCHNEIDER K, LAWSON E, DEAN C, ROBERTS K. Clonal relationships and cell patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development* 1994; **120**: 2465–2474.
- [11] DOLAN L, JANMAAT K, WILLEMSSEN V, LINSTED P, POETHIG S, ROBERTS B, SCHERES B. Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 1993; **119**: 71–84.
- [12] DRESSSELHAUS T. Cell-cell communication during double fertilization. *Curr Opin Plant Biol* 2006; **9**: 41–47.

- [13] DUCKETT CM, OPARKA KJ, PRIOR DAM, DOLAN L, ROBERTS K. Dye-coupling in the root epidermis of *Arabidopsis* is progressively reduced during development. *Development* 1994; **120**: 3247–3255.
- [14] EPEL BL. Plasmodesmata: composition, structure and trafficking. *Plant Mol Biol* 1994; **26**: 1343–1360.
- [15] ERWEE MG, GOODWIN PB. Characterization of the *Egeria densa* Planch. leaf symplast: inhibition of the intercellular movement of fluorescent probes by group II ions. *Planta* 1983; **158**: 320–238.
- [16] ERWEE MG, GOODWIN PB. Symplast domains in extrastelar tissues of *Egeria densa* Planch. *Planta* 1985; **163**: 9–19.
- [17] FAULKNER C, BRANDOM J, MAULE A, OPARKA K. Plasmodesmata 2004. Surfing the symplasm. *Plant Physiol* 2005; **137**: 607–610.
- [18] FIRE A, XU S, MONTGOMERY MK, KOSTAS SA, DRIVER SE, MELLO CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; **391**(6673): 806–811.
- [19] FISHER DB, OPARKA KJ. Post-phloem transport : principles and problems. *J Exp Bot* 1996; **47**: 1141–1154.
- [20] FLETCHER JC, BRAND U, RUNNING MP, SIMON R, MEYEROWITZ EM. Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3*. *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* 1999; **283**: 1911–1914.
- [21] GALWAY ME, McCULLY ME. The time course of the induction of callose in wounded pea roots. *Protoplasma* 1987; **139**: 77–91.
- [22] HAN YZ, HUANG BQ, ZEE SY, YUAN M. Symplastic communication between the central cell and the egg apparatus cells in the embryo sac of *Torenia fournieri* Lind. before and during fertilization. *Planta* 2000; **211**: 158–162.
- [23] HEINLEIN M. Plasmodesmata: dynamic regulation and role in macromolecular cell-to-cell signaling. *Curr Opin Plant Biol* 2002; **5**(6): 543–552.
- [24] HEINLEIN M, EPEL BL. Macromolecular transport and signaling through plasmodesmata. *Int Rev Cytol* 2004; **235**: 93–164.
- [25] HEJNOWICZ Z. Anatomia i histogeneza roślin naczyniowych. Wydawn. Nauk. PWN, Warszawa 2002.
- [26] HIGASHIYAMA T, KUROIWA H, KAWANO S, KUROIWA T. Guidance *in vitro* of the pollen tube to the naked embryo sac of *Torenia fournieri*. *Plant Cell* 1998; **10**: 2019–2031.
- [27] HOTH S, SCHNEIDERREIT A, LAUTERBACH C, SCHOLZ-STARKE J, SAUER N. Nematode infection triggers the *de novo* formation of unloading phloem that allows macromolecular trafficking of green fluorescent protein into syncytia. *Plant Physiol* 2005; **138**(1): 383–392.
- [28] JANIĄK A, SZAREJKO I. Genetyczne i molekularne podstawy rozwoju włókników u *Arabidopsis thaliana*. *Post Biol Kom* 2007; **34**: 409–424.
- [29] JENIK P, IRISH V. The *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA3* differentially regulates intercellular signaling required for petal and stamen development. *Development* 2001; **128**: 13–23.
- [30] JORGENSEN RA. RNA traffics information systemically in plants. *PNAS* 2002; **99**: 11561–11563.
- [31] KIM DH, ROSSI JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet* 2007; **8**(3): 173–184.
- [32] KIM J-Y. Regulation of short-distance transport of RNA and protein. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 45–52.
- [33] KIM I, HEMPEL FD, SHA K, PFLUGER J, ZAMBRYSKI PC. Identification of a developmental transition in plasmodesmata function during embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 2002; **129**: 1261–1272.
- [34] KIM I, KOBAYASHI K, CHO E, ZAMBRYSKI PC. Subdomains for transport via plasmodesmata corresponding to the apical-basal axis established during *Arabidopsis* embryogenesis. *PNAS* 2005a; **102**: 11945–11950.
- [35] KIM I, CHO E, CRAWFORD K, HEMPEL FD, ZAMBRYSKI PC. Cell-to-cell movement of GFP during embryogenesis and early seedling development in *Arabidopsis*. *PNAS* 2005b; **102**: 2227–2231.
- [36] KIM I, ZAMBRYSKI PC. Cell-to-cell communication via plasmodesmata during *Arabidopsis* embryogenesis. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 593–599.
- [37] KIRK V, SIMON M, HULSKAMP M, SCHEIFELBEIN J. The enhancer of try and CPC1 (ETC1) gene acts redundantly with TRIPTYCHON and CAPPRICE in trichome and root hair cell patterning in *Arabidopsis*. *Dev Biol* 2004; **268**: 506–513.
- [38] KLAHRE U, CRETE P, LEUENBERGER SA, IGLESIAS VA, MEINS F JR. High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. *PNAS* 2002; **99**: 11981–11986.

- [39] KOBAYASHI K, OTEGUI MS, KRISHNAKUMAR S, MINDRINOS M, ZAMBRYSKI P. Increased size exclusion limit2 encodes a putative DEVH Box RNA helicases involved in plasmodesmata function during *Arabidopsis* embryogenesis. *Plant Cell* 2007; **19**: 1885–1897.
- [40] KRAGLER F, LUCAS JW, MONZER J. Plasmodesmata: dynamics, domains and patterning. *Ann Bot* 1998; **81**: 1–10.
- [41] KRAGLER F, MONZER J, SHASH K, XOCONOSTLE-CAZARES B, LUCAS WJ. Cell-to-cell transport of proteins: Requirement for unfolding and characterization of binding to a putative plasmodesmal receptor. *Plant J* 1998; **15**: 367–381.
- [42] KURATA T, OKADA K, WADA T. Intercellular movement of transcription factors. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**(6): 600–605.
- [43] KURCZYŃSKA EU. Komunikacja symplastowa: terminologia, fluorochromy i embriogeneza *Arabidopsis thaliana*. *Post Biol Kom* 2008; **35**: 31–43.
- [44] KURCZYŃSKA EU, GAJ MD, UJCZAK A, MAZUR E. Histological analysis of direct somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* 2007; **226**(3): 619–628.
- [45] KWIATKOWSKA M. Zmiany ultrastruktury i rozmieszczenia plazmodesm a proces dyferencjacji na przykładzie anterydiostanów glonów z rodzaju *Chara*. *Post Biol Kom* 2004; **31** supl. 22: 157–174.
- [46] KWIATKOWSKA M. Autoradiographic studies on the role of plasmodesmata in the transport of gibberellin. *Planta* 1991; **183**: 294–299.
- [47] KWIATKOWSKA M, MASZEWSKI J. Changes in ultrastructure of plasmodesmata during spermatogenesis in *Chara vulgaris* L. *Planta* 1985; **166**: 46–50.
- [48] KWIATKOWSKA M, MASZEWSKI J. Changes in occurrence and ultrastructure of plasmodesmata in antheridia of *Chara vulgaris* L during different stages of spermatogenesis. *Protoplasma* 1986; **132**: 179–188.
- [49] LEE MM, SCHIEFELBEIN J. WEREWOLF, a MYB-related protein in *Arabidopsis*, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning. *Cell* 1999; **99**: 473–483.
- [50] LEE YS, NAKAHARA K, PHAM JW, KIM K, HE Z, SONTHEIMER EJ, CARTHEW RW. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 2004; **117**(1): 69–81.
- [51] LLAVE C, XIE Z, KASSCHAU KD, CARRINGTON JC. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science* 2002; **297**(5589): 2053–2056.
- [52] LUCAS JW, DING B, van der SCHOOT C. Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. *J Physiol* 1993; **125**: 435–476.
- [53] LUCAS JW, LEE J-Y. Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. *Nature* 2004; **5**: 712–726.
- [54] LUCAS JW, YOO BC, KRAGLER F. RNA as a long-distance information macromolecule in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; **2**(11): 849–857.
- [55] LYNDON RF. The Shoot Apical Meristem – Its Growth and Development. Cambridge, UK, Cambridge University Press 1998.
- [56] MAYER S, LAUTERBACH C, NIEDERMEIER M, BARTH I, SJOLUND RD, SAUER N. Wounding enhances expression of *AtSUC3*, a sucrose transporter from *Arabidopsis* sieve elements and sink tissue. *Plant Physiol* 2004; **134**: 684–693.
- [57] MURCHISON EP, HANNON GJ. miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr Opin Cell Biol* 2004; **16**(3): 223–229.
- [58] NOWAKOWSKA P, KOPCEWICZ J. Symplastowy transport białek i RNA u roślin. *Post Biol Kom* 2006; **33**: 473–491.
- [59] OHASHI Y, OKA A, RODRIGUES-POUSADA R, POSSENTIM, RUBERTI I, MORELLI G, AOYAMA T. Modulation of phospholipid signaling by GLABRA2 in root-hair pattern formation. *Science* 2003; **300**(5624): 1427–1430.
- [60] OLESON P, ROBARDS AW. The neck region of plasmodesmata: general architecture and some functional aspects. W: *Parallels in Cell to Cell Junctions in Plants and Animals*. [red.] AW Robards, WJ Lucas, JD Pitts, HJ Jongsma, Springer-Verlag, Berlin/New York/Tokyo 1990: 145–170.
- [61] OPARKA KJ, CRUZ SS. The great escape: phloem transport and unloading of macromolecules. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2000; **52**: 323–347.
- [62] OPARKA KJ, PRIOR DAM. Direct evidence for pressure-generated closure of plasmodesmata. *Plant J* 1992; **2**: 741–750.
- [63] PALEVITZ BA, HEPLER PK. Changes in dye coupling of stomatal cells of *Allium* and *Commelina* demonstrated by microinjection of lucifer yellow. *Planta* 1985; **16**: 4473–4479.
- [64] PATRICK JW. Phloem unloading: sieve element unloading and post-sieve element transport. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1997; **48**: 191–222.

- [65] PATRICK JW, OFFLER CE. Post-sieve element transport of photoassimilates in sink regions. *J Exp Bot* 1996; **47**: 1165–1177.
- [66] PERBAL M-C, HAUGHN G, SAEDLER H, SCHWARZ-SOMMER Z. Non-cell-autonomous function of the *Antirrhinum* floral homeotic proteins *DEFICIENS* and *GLOBOSA* is exerted by their polar cell-to-cell trafficking. *Development* 1996; **122**: 3433–3441.
- [67] RAMSAY NA, GLOVER BJ. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends Plant Sci* 2005; **10**(2): 63–70.
- [68] RINNE PL, KAIKURANTA PM, VAN DER SCHOOT C. The shoot apical meristem restores its symplasmic organization during chilling-induced release from dormancy. *Plant J* 2001; **26**(3): 249–264.
- [69] RINNE PLH, VAN DER SCHOOT C. Symplasmic fields in the tunica of the shoot apical meristem coordinate morphogenetic events. *Development* 1998; **125**: 1477–1485.
- [70] ROBERTS AG, OPARKA KJ. Plasmodesmata and the control of symplastic transport. *Plant Cell Environ* 2003; **26**: 103–124.
- [71] RUIZ-MEDRANO R, XOCONOSTALE-CÁZARES B, KRAGLER F. The plasmodesmatal transport pathway for homeotic proteins, silencing signals and viruses. *Curr Opin Plant Biol* 2004; **7**: 641–650.
- [72] SESSIONS A, YANOFSKY MF, WEIGEL D. Cell-cell signaling and movement by the floral transcription factors *LEAFY* and *APETALA1*. *Science* 2000; **289**: 779–781.
- [73] van der SCHOOT C, RINNE P. Networks for shoot design. *Trends Plant Sci* 1999; **4**: 31–37.
- [74] SOKOŁOWSKA K. Regulacja łączności symplastowej w procesach wzrostu i rozwoju roślin. *Post Biol Kom* 2005; **35**: 603–616.
- [75] SOWIŃSKI P. Plazmodesmy, jako element systemu komunikacji w roślinach. *Post Biol Kom* 2002; **29**: 627–635.
- [76] STADLER R, SAUER N. The *Arabidopsis thaliana* *AtSUC2* gene is specifically expressed in companion cells. *Bot Acta* 1996; **109**: 299–306.
- [77] STADLER R, LAUTERBACH C, SAUER N. Cell-to-cell movement of green fluorescent protein reveals post-phloem transport in the outer integument and identifies symplastic domains in *Arabidopsis* seeds and embryos. *Plant Physiol* 2005; **139**: 701–712.
- [78] STADLER R, WRIGHT KM, LAUTERBACH C, AMONG G, GAHRTZ M, FEUERSTEIN A, OPARKA KJ, SAUER N. Expression of GFP-fusions in *Arabidopsis* companion cells reveals non-specific protein trafficking into sieve elements and identifies a novel post-phloem domain in roots. *Plant J* 2005; **41**(2): 319–331.
- [79] SUN K, HUNT K, HAUSER BA. Ovule abortion in *Arabidopsis* triggered by stress. *Plant Physiol* 2004; **135**(4): 2358–2367.
- [80] SNEYD J, DUFOUR JF. A dynamic model of the type-2 inositol trisphosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**(9): 2398–2403.
- [81] STEWART SA, DYKXHOORN DM, PALLISER D, MIZUNO H, YU EY, AN DS, SABATINI DM, CHEN IS, HAHN WC, SHARP PA, WEINBERG RA, NOVINA CD. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA* 2003; **9**(4): 493–501.
- [82] ŚNIEŻKO R, CHUDZIK B. Zalążek jako aktywny partner w procesie rozmnażania generatywnego roślin kwiatowych. *Kosmos* 2003; **52**: 445–457.
- [83] TUCKER EB, BOSS WF. Mastoparan-Induced Intracellular Ca^{2+} Fluxes May Regulate Cell-to-Cell Communication in Plants. *Plant Physiol* 1996; **111**(2): 459–467.
- [84] TRUCKER JE, MAUZERALL D, TUCKER EB. Symplastic transport of carboxyfluorescein in staminal hairs of *Setcreasea purpurea* is diffusive and includes loss to the vacuole. *Plant Physiol* 1989; **90**: 1143–1147.
- [85] TRUCKER EB, TRUCKER JE. Cell-to-cell diffusion in staminal hairs of *Setcreasea purpurea*. *Protoplasma* 1993; **174**: 36–44.
- [86] TUCKER EB. Calcium-loaded 1,2-bis (2-aminophenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid blocks cell-to-cell diffusion of carboxyfluorescein in staminal hairs of *Setcreasea purpurea*. *Planta* 1990; **182**: 34–38.
- [87] TYREE MT, TAMMES PML. Translocation of uranin in the symplasm of staminal hairs of *Tradescantia*. *Revue canadienne de botanique* 1975; **53**: 2038–2046.
- [88] WADA T, TACHIBANA T, SHIMURA Y, OKADA K. Epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* determined by a Myb homolog, CPC. *Science* 1997; **277**(5329): 1113–1116.
- [89] WADA T, KURATA T, TOMINAGA R, KOSHINO-KIMURA Y, TACHIBANA T, GOTO K, MARKS MD, SHIMURA Y, OKADA K. Role of positive regulator of root hair development, *CAPRICE*, in *Arabidopsis* root epidermal cell differentiation. *Development* 2002; **129**: 5409–5419.

- [90] WANG HL, OFFLER CE, PATRICK JW. Cellular pathway of photosynthate transfer in the developing wheat grain. II. A structural analysis add histochemical studies of the transfer pathway from the crease phloem to the endosperm cavity. *Plant Cell Environ* 1995; **18**: 373–388.
- [91] WILLE AC, LUCAS WJ. Ultrastructural and histochemical studies on guard cells. *Planta* 1984; **160**: 129–142.
- [92] WILLMER CM, SEXTON R. Stomata and plasmodesmata. *Protoplasma* 1979; **100**: 113–124.
- [93] YEOM KH, LEE Y, HAN J, SUH MR, KIM VN. Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for *Drosha* in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Res* 2006; **34**(16): 4622–4629.
- [94] ZAMBRYSKI P, CRAWFORD K. Plasmodesmata: gatekeepers for cell-to-cell transport of developmental signals in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; **16**: 393–421.
- [95] ZHANG LY, PENG YB, PELLESCI-TRAVIER S, FAN Y, LU YF, LU YM, GAO XP, SHEN YY, DELROT S, ZHANG DP. Evidence for apoplasmic phloem unloading in developing apple fruit. *Plant Physiol* 2004; **135**(1): 574–586.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 15.05. 2008 r.

Przyjęto: 07.08. 2008 r.

ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice

M. Marzec, e-mail: marek.marzec@us.edu.pl

E.U. Kurczyńska, e-mail: euk@us.edu.pl