

MIRELA TULIK, ELŻBIETA MYŚKOW

Rola śmierci komórek drewna w sukcesie ewolucyjnym roślin drzewiastych

Contribution of wood cells death to evolutionary success of woody plants

ABSTRACT

Tulik M., Myśkow E. 2015. Rola śmierci komórek drewna w sukcesie ewolucyjnym roślin drzewiastych. Sylwan 159 (5): 392-402.

The paper describes the different types of cell death during the process of wood cell formation and terminological variety found in the literature concerned. The cell death referred to as programmed cell death (PCD), is genetically controlled and fundamental for the correct function of the whole organism of woody plants. The wood is mainly composed of the tracheary elements fulfil as conductors of water, fibers that provide the mechanical support and parenchyma cells playing an important role in the storage of water and reserve materials. The PCD of these elements constitutes the final stage of their differentiation and it is preceded by: (i) cambial cell divisions, (ii) the enlargement of the cambial derivatives. The successive phase concerns (iii) deposition of secondary cell walls and its lignification. After that, the cell commences to digest protoplast, what means that each cell participates in the process of its own demise actively. However, the time and the sequence of the appearance of these phases are distinct among the woody cells. In the case of the tracheary elements the digestion of the protoplast occurs immediately after the tonoplast breakdown. Therefore, these cells are short-lived elements of wood. The life span of the fibers and the parenchyma cells is longer (from month for fibers and years in case of parenchyma cells). For the latter cells the positional information (distance from the cambium) and vicinity with short-lived tracheary elements are considered to be important for undergoing the process of death.

KEY WORDS

autolysis, cell death, PCD, ray parenchyma, tracheary elements, fibers; wood differentiation

ADDRESSES

Mirela Tulik ⁽¹⁾ – e-mail: mirela.tulik@wl.sggw.pl
 Elżbieta Myśkow ⁽²⁾ – e-mail: elzbieta.myskow@uni.wroc.pl

⁽¹⁾ Samodzielny Zakład Botaniki Leśnej, SGGW w Warszawie; ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

⁽²⁾ Instytut Biologii Eksperymentalnej, Uniwersytet Wrocławski; ul. Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław

Wstęp

Utrzymanie homeostazy pomiędzy liczbą powstałych na drodze podziałów komórek a ich eliminacją jest jednym z elementów sukcesu ewolucyjnego organizmów roślinnych i zwierzęcych. U podstaw tej homeostazy leży kontrolowany genetycznie proces określany jako programowana śmierć komórek (PCD, ang. Programmed Cell Death). U organizmów zwierzęcych proces ten zwykle prowadzi do eliminowania komórek, które wypełniły już swoje funkcje. Przykładami PCD są zatem zmiany związane z eliminacją komórek dłoni i stóp ssaków, umożliwiające formowanie się palców, czy utrata ogonka kijanek żab w czasie metamorfozy w dorosłego płaza

[Baehrecke 2002; Maruniewicz, Wojtaszek 2007]. W przypadku roślin drzewiastych PCD warunkuje głównie opracowanie ostatecznego kształtu pojedynczej komórki, która w następstwie będzie funkcjonować jako element martwy wśród innych, żywych komórek ciała, co ma miejsce w przypadku elementów przewodzących drewna [Fukuda 1997]. Dla tych komórek PCD stanowi końcowy etap ich formowania, co jest warunkiem sprawnego transportu wody i pełnienia przez nie funkcji mechanicznej. Leży u podstaw wytworzenia wysokiej jakości surowca drzewnego.

Pierwsze obserwacje śmierci komórek prowadzono pod koniec XIX wieku, jednakże systematyczne badania rozpoczęły się dopiero w latach 50. ubiegłego wieku i dotyczyły głównie komórek organizmów zwierzęcych [Maruniewicz, Wojtaszek 2007]. W 2002 roku Sydney Brenner i John E. Sulston z Wielkiej Brytanii oraz H. Robert Horvitz ze Stanów Zjednoczonych otrzymali nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii za odkrycia dotyczące genetycznej regulacji organogenezy i zaprogramowanej śmierci komórki. Obiektem badań naukowców był nicien *Caenorhabditis elegans*. Badania jego rozwoju embrionalnego wykazały, że pewna, zawsze stała liczba komórek ulega degradacji w sposób wskazujący na istnienie podłoża genetycznego tego zjawiska [Baś i in. 2004]. Tematyka programowanej śmierci komórek pozostaje nadal w kręgu zainteresowań naukowców, ze względu na potencjalne wykorzystanie znajomości PCD np. w terapii nowotworowej.

W procesie PCD komórki aktywują własną maszynę molekularną, co prowadzi do ich samounicestwienia i oznacza, że paradoksalnie śmierć poszczególnych komórek decyduje o życiu całego organizmu, jego formie i przedłużeniu gatunku. Czy zatem programowana śmierć komórki może być postrzegana w kategoriach „sposób na życie” przez wielokomórkowe organizmy roślinne?

Morfotypy śmierci komórek u roślin

Pomimo dobrze poznanych molekularnych mechanizmów śmierci komórki, jako integralnego procesu rozwojowego, klasyfikacja typów śmierci komórek u roślin rodzi pewne trudności. W literaturze można spotkać następujące terminy: apoptoza, nekroza, autoliza, autofagia lub inne – np. reakcja nadwrażliwości (ang. hypersensitive response) indukowana oddziaływaniem patogena [Havel, Durzan 1996; Fukuda 1997; van Doorn, Woltering 2005; Della Mea i in. 2007; Reape i in. 2008; van Doorn 2011; van Doorn i in. 2011].

Apoptoza (gr. apoptosis – opadanie, również opadanie liści czy płatków) jest związana z destrukcją cytoszkieletu oraz aktywnością białek (enzymów proteolitycznych) określanych mianem kaspaz. Do morfologicznych objawów apoptozy należą obkurczanie i zmniejszenie się objętości komórki na skutek utraty wody, kondensacja chromatyny, fragmentacja jądrowego DNA oraz tworzenie obłonionych pęcherzyków (ciałek apoptotycznych). Pęcherzyki te są następnie trawione przez makrofagi, czyli sąsiednie komórki żerne. U organizmów roślinnych brak jest komórek żernych, a obecność ściany komórkowej uniemożliwia proces fagocytozy komórek podlegających PCD. Te wyraźne różnice wskazują, że u roślin PCD nie przebiega na drodze apoptozy [van Doorn, Woltering 2005; Maruniewicz, Wojtaszek 2007; van Doorn in. 2011].

Van Doorn i in. [2011] w oparciu o morfologiczne kryteria wyróżnili u roślin dwie główne klasy śmierci. Pierwszą z nich jest śmierć „wakuolarna” (ang. vacuolar cell death), w literaturze polskiej określana jako ta, która przebiega na drodze autofagii lub autolizy (ang. autolytic PCD). Drugim typem śmierci jest nekroza, zachodząca pod wpływem działania czynników zewnętrznych prowadzących do uszkodzenia komórki, niewynikająca z realizacji programu genetycznego. Jest zatem bierną, patologiczną formą śmierci komórki. „Wakuolarna” śmierć związana jest z posiadaniem przez komórki roślinne systemu wakuolarnego, który w odróżnieniu od lizo-

somów komórek zwierzęcych może zajmować znaczną objętość komórki roślinnej [Marty 1999]. Roślinne wakuole, podobnie jak lizosomy, uczestniczą w trawieniu i magazynowaniu produktów procesów metabolicznych. Morfotyp wakuolarny śmierci komórki związany jest zatem z zachowaniem funkcji cytoszkieletu [Smertenko, Frankiln-Tong 2011], gromadzeniem w wakuoli enzymów litycznych oraz ze stopniową wakuolizacją cytoplazmy [van Doorn 2011; van Doorn i in. 2011]. Za moment śmierci komórki uważa się pęknięcie tonoplastu, czyli błony otaczającej wakuolę i uwolnienie enzymów hydrolitycznych, które trawią protoplast [Obara i in. 2001; Courtois-Moreau i in. 2009; Bollhöner i in. 2012]. Jednakże dokładne analizy procesu PCD, prowadzone na różnych typach komórek roślinnych, wykazały, że proces ten nie jest jednorodny. Niniejsza praca przedstawia różnorodność wariantów PCD obecnych w czasie różnicowania poszczególnych typów komórek drewna.

PCD elementów trachealnych

Drewno iglastych i dwuliściennych obejmuje elementy systemu osiowego oraz promieniowego [Esau 1965]. U iglastych system osiowy reprezentowany jest przez cewki (jodła, cis), a u większości gatunków dodatkowo przez niewielką ilość miękiszu osiowego oraz przewody żywiczne (sosna, świerk, modrzew). Cewki to wyspecjalizowane komórki, które pełnią zarówno funkcję przewodzącą, jak i wzmacniającą. U dwuliściennych system osiowy obejmuje natomiast naczynia, które odpowiedzialne są za transport wody, oraz włókna i cewki pełniące funkcję mechaniczną. Stwierdza się też większy, w porównaniu z drewnem iglastych, udział miękiszu drzewnego. Cewki i naczynia określane są wspólnie jako elementy trachealne [Turner i in. 2007; Bollhöner i in. 2012; Demura 2014], a ich proces różnicowania zakończony zostaje śmiercią komórki, w którym kluczową rolę pełni wakuola [Wodzicki, Brown 1973; Fukuda 2000].

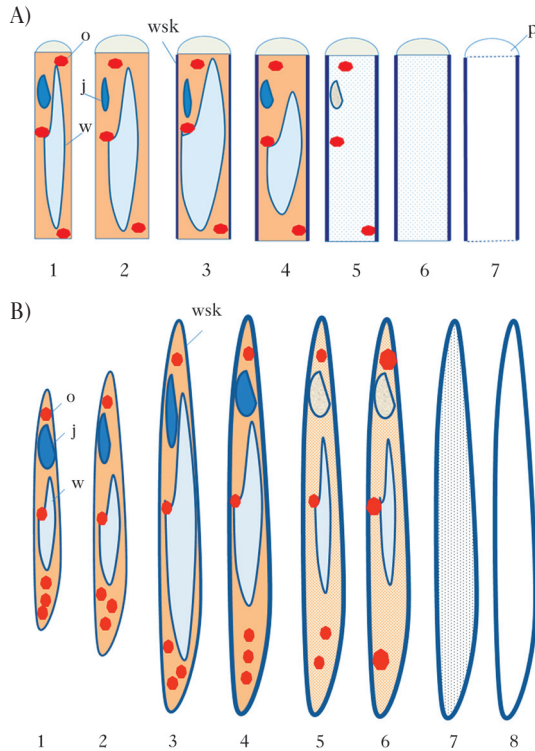
Proces różnicowania wszystkich elementów drewna wtórnego z kambium jest podobny. Po podziale inicjału kambialnego wszystkie różnicujące się komórki po stronie drewna wyglądają podobnie [Courtois-Moreau i in. 2009], następnie rosną na długość oraz szerokość i na tym etapie możliwe jest już rozróżnienie poszczególnych typów komórek. Kolejną fazą jest odkładanie wtórnej ściany, a następnie włączenie kontrolowanego genetycznie programu śmierci protoplastu [Fukuda 1996; Bollhöner i in. 2012]. Obecnie uważa się, że proces lignifikacji jest kontynuowany już po obumarciu protoplastu [Pesquet i in. 2013; Escamez, Tuominen 2014]. Jednakże w różnych typach komórek drewna etapy i czas ich zachodzenia mogą się różnić [Bollhöner i in. 2012]. Różnicowanie i zamieranie cewek, członów naczyń oraz włókien trwa od kilka dni do około dwóch miesięcy [Bollhöner i in. 2012], natomiast komórki miękiszowe promieni pozostają żywe nawet przez kilka lat [Funada 2000; Spicer, Holbrook 2007].

Jedne z pierwszych szczegółowych analiz PCD w komórkach drewna przeprowadzili Wodzicki [1971] oraz Wodzicki i Brown [1973]. Autorzy opisali morfologiczne i anatomiczne modyfikacje zachodzące w cewkach, począwszy od fazy związanej z podziałem komórki kambialnej na stronę drewna, aż do programowanej śmierci komórki. W procesie tworzenia się drewna Wodzicki [1971] wyróżnił fazę kambialną (C), wzrostu promieniowego (G), maturacji (D) oraz cewek dojrzałych (T). W fazie wzrostu promieniowego komórka różnicująca się na cewkę rośnie w kierunku radialnym, natomiast w fazie maturacji odkłada wtórną ścianę komórkową [Wodzicki, Humpherys 1972]. Badania Wodzickiego i Browna [1973] pozwalają przedstawić scenariusz różnicowania się cewki. W początkowym okresie tworzenia wtórnej ściany komórkowej różnicująca się cewka charakteryzuje się obecnością cytoplazmy parietalnej, czyli cienkiej warstwy cytoplazmy przylegającej do ściany komórkowej, w której zawieszono są organella komórkowe. Wewnątrz komórki znajduje się duża wakuola otoczona tonoplastem, który oddziela cytoplazmę parietalną od soku

komórkowego. W tworzeniu kompartmentu wakuolarnego uczestniczy retikulum endoplazmatyczne. Wodzicki i Brown [1973] zaobserwowali, że nici cytoplazmatyczne (transwakuolarnie) pozostające w kontakcie z cytoplazmą parietalną przenikają centralną wakuolę. Z nici tych odpączkują następnie pęcherzyki, których zawartość trawiona jest w soku komórkowym zawierającym enzymy hydrolityczne. Produkty autofagii są wchłaniane przez nici cytoplazmatyczne i cytoplazmę parietalną, gdzie ulegają przetworzeniu na substraty niezbędne do odłożenia wtórnej ściany komórkowej. W kolejnym etapie różnicowania się cewki aktywowane są enzymy odpowiedzialne za syntezę prekursorów ligniny oraz enzymy, które aktywują syntezę ligniny w ścianie komórkowej [Samuels i in. 2002, 2006]. Doprowadza to do grubienia i drewnienia ściany komórkowej różnicujących się cewek [Roberts 1976]. W ten sposób białkowe składniki ściany zabezpieczane są przed aktywnością enzymów hydrolitycznych, uwalnianych z wakuoli w końcowym etapie maturacji, co nieuchronnie prowadzi do śmierci komórki [Groover, Jones 1999]. W tym etapie maturacji następuje bowiem destrukcja nici cytoplazmatycznych przenikających wakuolę oraz przerwanie ciągłości tonoplastu, czego konsekwencją jest odsłonięcie cytoplazmy i jej całkowita liza. Ostatnim trawionym elementem komórkowym dojrzewającej cewki jest jądro komórkowe [Wodzicki, Brown 1973].

Według Wodzickiego [1971] średnica cewek drewna wczesnego uzależniona jest głównie od intensywności wzrostu w kierunku promieniowym, zaś grubość ściany komórkowej od czasu trwania jej odkładania. Wtórna ściana komórkowa cewek drewna wczesnego odkładana jest w okresie około dwóch tygodni, zaś cewek drewna późnego w czasie około 50 dni. Powstawanie cewek jest zatem klasycznym przykładem PCD [Greenberg 1996; Pennell, Lamb 1997], której efektem jest powstanie komórki pozbawionej protoplastu, a funkcjonalnym jej elementem jest jamkowa ściana komórkowa.

Proces różnicowania członów naczyń zakończony jest obumieraniem protoplastu oraz lizą fragmentów pierwotnych ścian komórkowych, co umożliwia wytworzenie płyt perforacyjnych. Poznanie tego procesu możliwe było dzięki wykorzystaniu modelu badawczego, jakim jest hodowla *in vitro* izolowanych komórek miększu asymilacyjnego *Zinnia elegans* i wymuszone hormonalnie (poprzez dodanie do pożywki związków z grupy auksyn i cytokinin) ich różnicowanie w kierunku członów naczyń [Fukuda i in. 1993]. Komórki izolowane z miększu asymilacyjnego *Z. elegans*, zatrzymane w rozwoju w fazie G1 cyklu komórkowego i przeniesione na pożywkę zawierającą w składzie m.in. syntetyczną auksynę, „wchodzą” na drogę odróżnicowania. W czasie 60-80 godzin około 30-60% ich populacji różnicuje się na naczynia [Fukuda 1992, Demura 2014]. W procesie tym, któremu towarzyszą zmiany ekspresji genów oraz ultrastruktury tych komórek, wyróżnić można te same sekwencje zdarzeń, które charakterystyczne są dla powstających naczyń w warunkach *in situ* [Fukuda i in. 1998]. Powstaje m.in. wtórna ściana komórkowa, po pojawieniu się której następuje destrukcja wakuoli oraz strawieniu ulegają inne struktury wewnątrzkomórkowe (ryc. 1A) [Fukuda 2000]. Początkowo w czasie różnicowania elementów trachealnych dochodzi do zwiększania objętości wakuoli kosztem cytoplazmy, co rozpoczyna trawienie niektórych organelli. Badania wskazują, że na tym etapie następuje wpuklenie błony wakuolarniej i jej fuzja z pęcherzykami cytoplazmatycznymi. Kluczowym etapem PCD w członach naczyń jest pęknięcie tonoplastu otaczającego wakuolę, co uwalnia hydrolazy i prowadzi do natychmiastowego zniszczenia protoplastu [Obara i in. 2001; van Doorn 2011; van Doorn i in. 2011; Escamez, Tuominen 2014]. Degradacja DNA jądrowego, chloroplastowego i mitochondrialnego (organelli otoczonych podwójną błoną komórkową) zachodzi najczęściej już po przerwaniu tonoplastu [Obara i in. 2001]. Pęcherzyki cytoplazmatyczne zawierające enzymy hydrolityczne przemieszczają się do błony komórkowej (plazmalemy) i po połączeniu się z nią wydzielają swoją



Ryc. 1.

Zmiany morfologiczne różnicującego się elementu trachealnego (A) oraz włókna drzewnego (B) [Bollhöner i in. 2012, zmodyfikowane]

Morphological changes during differentiation of the tracheary element (A) and fibre (B) [Bollhöner et al. 2012, modified]

A. Różnicowanie się elementu trachealnego obejmuje: pochodną kambialną różnicującą się na element trachealny (na człon naczyniowy) (1), wzrost różnicującego się elementu trachealnego (2), odkładanie wtórnej ściany komórkowej (3), zmiany w przepuszczalności tonoplastu oraz przerwanie jego ciągłości (4), degradację jądra komórkowego (5), całkowitą autolizę protoplastu (6) oraz częściową hydrolizę niezłignifikowanej pierwotnej ściany komórkowej (powstanie perforacji) (7)

B. Różnicowanie się włókna drzewnego obejmuje: pochodną kambialną różnicującą się na włókno drzewne (1), wzrost różnicującej się komórki (2), odkładanie wtórnej ściany komórkowej (3), utratę turgoru (4), stopniowy zanik organelli komórkowych, rozpoczęcie autolizy i degradacja DNA (5), powiększenie wymiarów pozostałych jeszcze organelli komórkowych (6), dalszy postęp autolizy po pęknięciu tonoplastu (7), powstanie martwej, pustej w środku komórki włókna drzewnego (8)

A. Differentiation of the tracheary element includes: cambial derivative starts differentiation into tracheary element (tracheary element means vessel member) (1), enlargement of the differentiating tracheary element (2), secondary walls formation (3), changes in permeability and vacuolar rapture (4), degradation of nucleus (5), final autolysis (6), and partial hydrolysis of the non-lignified primary cell walls (perforation is formed) (7)

B. Fibre differentiation includes: cambial derivative starts differentiation into fibre (1), cell expansion (2), deposition of the secondary cell walls (3), loss of turgor (4), disappearance of the organelles, starting autolysis and degradation of DNA (5), swelling of the remaining organelles and continued autolysis (6), autolysis after vacuolar rapture (7), dead fibre appearances (8)

j – jądro komórkowe, o – organellum komórkowe, p – perforacja, w – wakuola, wsk – wtórna ściana komórkowa
j – nucleus, o – organelle, p – perforation w – vacuole, wsk – secondary cell wall

zawartość poza obręb komórki. Mechanizm ten leży u podstaw procesu hydrolizy pierwotnej ściany komórkowej związanej z wytwarzaniem perforacji w ścianie łączącej nadległe człony naczyń [O'Brien 1970].

Proces powstawania elementów trachealnych kończący się śmiercią komórki znajduje się pod kontrolą czynników egzogennych (fotoperiod, temperatura) i endogennych (ekspresja wybranych genów, hormony) oraz jest wynikiem interakcji między tymi czynnikami [Williams, Dickman 2008]. Również mechaniczne zranienia mogą indukować proces odróżnicowania się komórek miękkiszowych w elementy trachealne [Fukuda 1996]. Spośród hormonów roślinnych szczególną uwagę zwraca się na związki chemiczne z grupy auksyn i cytokinin (m.in. stymulują podziały komórkowe) oraz brasinosteroidy (niezbędne dla przebiegu maturacji). Czynnikiem uważanym z kolei za inhibitor procesu różnicowania się elementów trachealnych jest białko TDIF wydzielane przez komórki floemu [Hirakawa i in. 2010; Qiang i in. 2013].

Dla poznania molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie elementów trachealnych identyfikowane są geny, których białkowe produkty odpowiadają nie tylko za prawidłowy przebieg PCD, ale biorą także udział w procesie tworzenia wtórnej ściany komórkowej oraz jej lignifikacji [Groover, Jones 1999; Roberts, McCann 2000; Bollhöner i in. 2012]. Szczególnie istotne dla przebiegu obu procesów są czynniki transkrypcyjne z klasy NAC – VASCULAR-RELATEDNAC-DOMAIN6 (VND6) i VND7 – uruchamiające całą kaskadę kolejnych genów [Ohashi-Ito i in. 2010; Escamez, Tuominen 2014; Zhang i in. 2014], co objawia się tym, że zahamowanie farmakologiczne jednego z procesów ogranicza również zachodzenie drugiego [Bollhöner i in. 2012]. Motose i in. [2004] sugerują, że dla ciągłości procesu różnicowania elementów trachealnych jest również istotne międzykomórkowe oddziaływanie. Ich badania nad różnicowaniem drewna w kulturze *in vitro* *Zinnia elegans* wykazały, że białko o nazwie ksylogen jest gromadzone w prokambium oraz drewnie. W ścianie komórkowej elementów trachealnych ksylogen akumulowany jest w sposób polarny i jego asymetryczna sekrecja przyczynia się do wejścia sąsiednich komórek na drogę różnicowania w kierunku elementów trachealnych.

PCD włókien drzewnych

Włókna wykorzystywane są przez człowieka w wielu gałęziach przemysłu – począwszy od przemysłu włókienniczego (len, konopie, bawełna), przez przemysł papierniczy, budownictwo, aż do produkcji energii. Jednakże termin „włókno”, biorąc pod uwagę anatomię roślin, obejmuje kilka typów komórek roślinnych. Należą tu komórki pochodzenia pierwotnego, jak np. włókna sklerenchymatyczne pełniące funkcje mechaniczne oraz długie włoski epidermalne (włókna bawełny) pełniące funkcje ochronne. Włókna mogą być również wytworem kambium i tworzone są zarówno w łyku, jak i w drewnie. Włókna mogą pozostawać żywe w roślinie lub w czasie różnicowania może dochodzić do ich programowanej śmierci [Lev-Yadun 2010; Gorshkova i in. 2012]. Tworzona w takim przypadku bardzo gruba ściana komórkowa wtórna pełni funkcję mechaniczną [Myburg, Sederoff 2001].

Proces programowanej śmierci włókien drzewnych został bardzo dobrze opisany na podstawie różnicowania włókien u topoli [Courtois-Moreau i in. 2009]. Jednym z pierwszych wyznaczników PCD we włóknach jest zmiana kształtu jądra komórkowego, które staje się bardziej okrągłe (ryc. 1B). Zmiana ta sugeruje zmniejszenie ciśnienia osmotycznego wakuoli, co jest związane ze zmianą przepuszczalności tonoplastu. W tym samym czasie cytoplazma zmniejsza swoją gęstość, a poszczególne organella komórkowe są trawione jeszcze przed pęknięciem tonoplastu, co odróżnia ten proces od PCD zachodzącego w naczyniach [Obara i in. 2001; Courtois-Moreau i in. 2009; Bollhöner i in. 2012]. Kolejny etap – pęknięcie tonoplastu – uznawany jest za wyznacznik momentu śmierci komórki i prowadzi do natychmiastowej autolizy pozostałości komórki. Degradacja DNA we włóknach rozpoczyna się przed pękaniem tonoplastu, co także odróżnia ten proces od PCD członów naczyń [Courtois-Moreau i in. 2009]. Obumieranie włókien odbywa się mniej więcej synchronicznie na całym obwodzie tworzącego się przyrostu rocznego drewna [Courtois-Moreau i in. 2009].

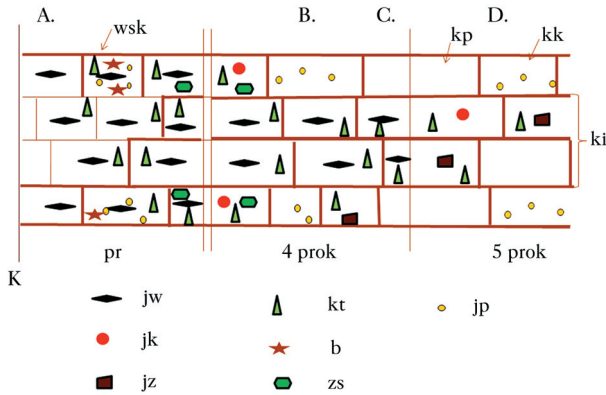
Obecnie uważa się, że tworzenie w członach naczyń wtórnej ściany komórkowej, jak i PCD kontrolowane jest przez wspólną kaskadę czynników transkrypcyjnych z klasy NAC [Ohashi-Ito i in. 2010; Bollhöner i in. 2012; Escamez, Tuominen 2014; Zhang i in. 2014]. Jednakże inny czynnik transkrypcyjny z tej klasy – SECONDARY WALL-ASSOCIATED NAC DOMAIN PROTEIN1 (SND1) – który bierze udział w tworzeniu ściany komórkowej włókien, nie uczestniczy w uruchamianiu kaskady genów związanych z procesem PCD, co również wskazuje na odmiennosc mechanizmów PCD w naczyniach i włóknach [Ohashi-Ito i in. 2010]. Kontrola

PCD we włóknach może być związana z sygnalizacją spowodowaną światłem [Courtois-Moreau i in. 2009]. Wydaje się, że w przypadku włókien wydłużenie PCD może być związane z koniecznością remobilizacji składników pokarmowych z protoplastu obumierających komórek, podobnie jak ma to miejsce podczas starzenia się liści, gdzie również obserwowano wydłużony proces PCD [van Doorn, Woltering 2005; Bollhöner i in. 2012].

PCD komórek mięksiszowych promieni drzewnych

System promieniowy drewna u iglastych i dwuliściennych reprezentowany jest przez promienie drzewne. U sosny, modrzewia czy świerka promień drzewny jest niejednorodny, tzn. zbudowany jest z cewek poprzecznych i komórek mięksiszowych. U jodły czy cisa ma budowę jednorodną, czyli jego strukturę tworzą tylko komórki mięksiszowe. Natomiast u dwuliściennych promień drzewny jest zbudowany tylko z komórek mięksiszowych. Jednakże wśród tych komórek występuje zróżnicowanie morfologiczne, tzn. u dębu czy jesionu wszystkie komórki mięksiszowe są podobnych kształtów (promień jednakokomórkowy), podczas gdy u wierzby, grabu, derenia oraz u wielu drzew tropikalnych w promieniach występują komórki stojące, wydłużone osiowo oraz komórki leżące, których wymiar promieniowy jest większy od osiowego (promień różnokomórkowy). Jeżeli komórki mięksiszowe u dwuliściennych posiadają połączenie za pomocą jamek z naczyniami, to określa się je mianem komórek kontaktowych [Braun 1967]. W sytuacji gdy takie połączenie nie jest wykształcone, określa się je jako komórki izolowane [Sauter, Kloth 1986]. Nakaba i in. [2012a] w promieniu jednakokomórkowym u topoli, ze względu na lokalizację komórek mięksiszowych, wyróżniają ponadto komórki położone na krawędziach promienia drzewnego i określają je jako komórki kontaktowe i pośrednie, natomiast te stanowiące środkową część promienia jako komórki izolowane (ryc. 2).

Funkcją promieni drzewnych jest zapewnienie ciągłości radialnej w pniu (pomiędzy drewnem a łykiem), magazynowanie, przewodnictwo [Murakami i in. 1999; Chaffey, Barlow 2001] oraz rola sekrecyjna związana m.in. z tworzeniem twardej tkanki [Hillis 1987; Magel 2000; Nakaba i in. 2012b]. U dwuliściennych, pomimo iż komórki kontaktowe, jak i izolowane pochodzą od tej samej komórki kambialnej, ich funkcja jest zróżnicowana [Braun 1970]. Uważa się, że komórki izolowane są bardziej wyspecjalizowane w funkcji transportu radialnego, podczas gdy kontaktowe pełnią funkcję ochronną w odniesieniu do innych żywych komórek mięksiszowych oraz odpowiedzialne są za tworzenie wcisstek [Murakami i in. 1999]. Postuluje się zatem inny mechanizm ich różnicowania, który zakończony zostaje śmiercią komórki. Mechanizm różnicowania się komórek mięksiszowych obu typów jest odmienny również od wzoru różnicowania naczyń oraz cewek systemu osiowego i poprzecznego. Różnica ta dotyczy głównie faktu, iż naczynia i cewki to komórki, których organelle komórkowe ulegają strawieniu zaraz po wykształceniu wtórnej ściany komórkowej oraz lignifikacji [Funada i in. 2000], podczas gdy komórki mięksiszowe żyją długo, a o czasie ich życia i śmierci decydują dwa czynniki: tzw. informacja pozycyjna oraz sąsiedztwo z krótko żyjącymi elementami trachealnymi [Nakaba i in. 2006; 2008, 2012a, b; Islam i in. 2012]. Badania dotyczące morfologii jądra komórkowego (zmiany kształtu z wrzecionowatego, poprzez kolisty, do zdeformowanego) oraz wzoru i czasu odkładania wtórnej ściany na powierzchni ściany pierwotnej komórek mięksiszowych, zarówno u iglastych, jak i dwuliściennych, wykazują, że odległość od kambium odgrywa decydującą rolę w określaniu czasu funkcjonowania i śmierci komórek mięksiszowych (ryc. 2) [Nakaba i in. 2006, 2012a]. Prowadząc badania nad mieszańcem topól Nakaba i in. [2012a] wykazali, że fakt wykształcenia kontaktu między komórkami mięksiszowymi promienia drzewnego a naczyniami przyczynia się do wcześniejszej śmierci komórek mięksiszowych kontaktowych w porównaniu z komórkami izolowanymi. Stawiają tezę, iż sygnał o nieznanym jak dotąd naturze, pochodzący od krótko żyjących naczyń,



Ryc. 2.

Różnicowanie komórek mięksiszowych promienia drzewnego *Populus sieboldii* × *P. grandidentata* [Nakaba i in. 2012a, zmodyfikowane]

Differentiation of ray parenchyma cells in *Populus sieboldii* × *P. grandidentata* wood [Nakaba et al. 2012a, modified]

A. W przyroście rocznym tuż przy kambium (K) odkładanie wtórnej ściany komórkowej (linia pogrubiona) rozpoczynają komórki kontaktowe (gromadzące białka) oraz pośrednie, które gromadzą ziarna skrobi. Zlokalizowane są one krawędziach promienia drzewnego (górna i dolne rzędy promienia). Komórki izolowane (zlokalizowane wewnątrz promienia) gromadzą mniejsze ilości materiału zapasowego;

B. Najwcześniejszej obumierają komórki kontaktowe, co obserwuje się w czwartym przyroście rocznym, licząc od kambium. Po śmierci komórki nie zawierają materiału zapasowego w postaci kropli tłuszczów oraz białek;

C. Nieco później, ale również w czwartym przyroście rocznym w kierunku od kambium, obumierają komórki pośrednie. Nie gromadzą po śmierci ziaren skrobi i kropli tłuszczów;

D. W piątym przyroście rocznym, licząc od kambium, obumierają komórki izolowane.

K – położenie kambium, wsk – odkładanie wtórnej ściany komórkowej, kp – komórka pośrednia, kk – komórka kontaktowa, ki – komórka izolowana, pr – przyrost roczny tuż przy kambium, 4 prok – czwarty przyrost roczny w kierunku od kambium, 5 prok – piąty przyrost roczny w kierunku od kambium, jw – jądro wrzecionowate, jk – jądro kuliste, jz – jądro zdeformowane, kt – krople tłuszczu, b – białko, zs – ziarna skrobi, jp – jamka półlejkowata pomiędzy komórką mięksiszową promienia (kontaktową) a członem naczyniowym

A. The initiation of secondary wall thickenings occurred earlier in contact cells and intermediate cells that were located within the upper and lower cell lines of each ray in the annual wood ring close to cambium (K). Contact cells contained large quantities of protein while intermediate cells gathered numerous starch grains. Isolation cells contained less storage material;

B. The earliest death of contact cells was observed in the fourth annual ring from the cambium. Proteins and lipid droplets were not amassed by contact cells after their death;

C. In intermediate cells, cell death occurred later than in contact cells in the fourth annual ring from the cambium. Starch grains and lipid droplets had disappeared from intermediate cells in the fourth annual ring from the cambium;

D. In the fifth annual ring from the cambium, isolation cells start to die.

K – location of cambial cells, wsk – secondary cell wall deposition, kp – intermediate cell, kk – contact cell, ki – isolate cell, pr – annual wood ring close to cambium, 4 prok – 4th annual ring from the cambium, 5 prok – 5th annual ring from the cambium, jw – fusiform nucleus, jk – spherical nucleus, jz – deformed nucleus, kt – lipid droplet, b – protein, zs – grain of starch, jp – half bordered pit between contact cell and vessel member

wpływa na sposób różnicowania się komórek kontaktowych. Wynik ten jest potwierdzeniem istniejących danych literaturowych [Nabuchi i in. 1979; Gartner i in. 2000]. Maurakami i in. [1999] sugerują, że komórki kontaktowe mogą zatem być wyspecjalizowanymi elementami uczestniczącymi w transporcie wody pomiędzy promieniem a naczyniami. Tymczasem komórki izolowane, posiadając niezłignifikowaną jeszcze styczną ścianę komórkową, pozostają nadal żywe i stanowią radialną ciągłość pomiędzy drewnem a łykiem.

O ile mechanizm różnicowania się krótko żyjących elementów trachealnych zakończony PCD jest dość dobrze poznany, to proces śmierci komórek mięksiszowych promienia drzewnego i mięksiszu, który reprezentuje system osiowy zarówno pod względem mechanizmów komórkowych, jak i molekularnych, nadal pozostaje nie do końca wyjaśniony.

Podsumowanie

Sukces ewolucyjny roślin drzewiastych rozpoczął się w sylurze, około 400 mln lat temu, wraz z powstaniem roślin naczyniowych posiadających pierwsze komórki umożliwiające przewodzenie wody (cewki w drewnie) i substancji odżywczych (komórki sitowe w łyku). Wytworzenie cewek możliwe było dzięki wykształceniu złignifikowanej wtórnej ściany komórkowej oraz umiejętności przewodzenia przez komórkę jej programowanej śmierci. U najstarszych roślin naczyniowych komórki o takich cechach pełniły jedynie funkcje przewodzące.

Zmiany zachodzące w toku ewolucji w budowie i funkcjonowaniu tkanki przewodzącej doprowadziły do wytworzenia drewna wtórnego, którego komórki pełnią zarówno funkcje przewodzące (cewki, człony naczyń), jak i mechaniczne (cewki, włókna) na tyle efektywnie, że możliwe stało się funkcjonowanie roślin drzewiastych osiągających olbrzymie rozmiary (np. *Sequoiadendron giganteum* czy *Eucalyptus regnans*) [Thomas 2000].

Procesy tworzenia ściany komórkowej oraz PCD elementów trachealnych, włókien i komórek mięksiszowych stanowią etapy programu dojrzewania komórek drewna. Dla prawidłowego funkcjonowania ostatecznie martwej komórki tej tkanki włączenie programu śmierci musi być ściśle kontrolowane i skorelowane z tworzeniem ściany wtórnej. Przerwanie tonoplastu nie może zająć zbyt szybko, gdyż skutkowałoby nieprawidłowym wytworzeniem ściany wtórnej. Najnowsze badania pokazują, że również na poziomie genetycznym procesy te są ze sobą powiązane, gdyż w członach naczyń tworzenie wtórnej ściany komórkowej, jak i PCD kontrolowane jest przez wspólną kaskadę czynników transkrypcyjnych z klasy NAC [Ohashi-Ito i in. 2010; Bollhöner i in. 2012; Escamez, Tuominen 2014]. W przypadku włókien procesy te są rozdzielone, gdyż czynnik transkrypcyjny z klasy NAC – SND1 uczestniczy jedynie w tworzeniu ściany wtórnej.

Programowana śmierć komórki jest procesem skomplikowanym, wieloetapowym, ale też niezmiernie ciekawym – komórka „popelnia samobójstwo”, które ostatecznie umożliwia funkcjonowanie organizmu jako całości. Dla każdej komórki i każdego organizmu jest czas życia i czas śmierci. Komórki drewna są pod tym względem szczególne, gdyż w zależności od pełnionej w organizmie funkcji zarówno przebieg samego procesu PCD, jak i czas, w którym ten proces się odbywa, są odmienne. I tak elementy trachealne obumierają zaraz po maturacji, podczas gdy przebieg PCD we włóknach i komórkach mięksiszowych jest wydłużony i związany najprawdopodobniej z koniecznością remobilizacji składników odżywczych z obumierających komórek [van Doorn, Woltering 2005; Bollhöner i in. 2012].

Poznanie wszystkich aspektów procesu ksylogenezy wydaje się mieć ogromne znaczenie dla wielu gałęzi przemysłu. Użycie współczesnych metod biologii molekularnej pozwala nie tylko poznać sam proces ksylogenezy, ale może przyczynić się też do uzyskania tkanki drzewnej o jak najlepszych parametrach fizyko-mechanicznych.

Literatura

- Bachrecke E. H. 2002. How death shapes life during development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 779-787.
- Baś M., Cywińska A., Sokołowska J., Krzyżowska M. 2004. Apoptoza – programowana śmierć komórki. Część III. Rola apoptozy w procesach fizjologicznych i patologicznych. *Życie Weterynaryjne* 79: 671-675.
- Bollhöner B., Prestele J., Tuominen H. 2012. Xylem cell death: emerging understanding of regulation and function. *J. Exp. Bot.* 63 (3): 1081-1094.
- Braun H. J. 1967. Development and structure of wood rays in view of contact-isolation differentiation to hydrosystem. *Holzforschung* 21: 33-37.
- Braun H. J. 1970. Funktionelle histologie der sekundären sproäasche. I. Das Holz. W: Zimmermann W., Ozenda P., Wulff H. D. [red.]. *Handbuch der Pflanzenanatomie*, vol. IX. Berlin, Gebrüder Bornträger.
- Chaffey N. J., Barlow P. 2001. The cytoskeleton facilitates a three-dimensional symplastic continuum in the long-lived ray and axial parenchyma cells of angiosperm trees. *Planta* 213: 811-823.
- Courtois-Moreau C. L., Pesquet E., Sjödin A., Muñoz L., Bollhöner B., Kaneda M., Samuels L., Jansson S., Tuominen H. 2009. A unique program for cell death in xylem fibers of *Populus* stem. *Plant J.* 58: 260-274.
- Della Mea M., Serafini-Fracassini D., Del Duca S. 2007. Programmed cell death: similarities and differences in animals and plants. A flower paradigm. *Amino Acids* 33: 395-404.
- Demura T. 2014. Tracheary element differentiation. *Plant Biotechnol. Rep.* 8: 17-21.
- van Doorn W. G. 2011. Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. *J. Exp. Bot.* 62 (14): 4749-4761.
- van Doorn W. G., Beers E. P., Dangl J. L., Franklin-Tong V. E., Gallois P., Hara-Nishimura I., Jones A. M., Kawai-Yamada M., Lam E., Mundy J., Mur L. A. J., Petersen M., Smertenko A., Taliensky M., van Breusegem F., Wolpert T., Woltering E., Zhivotovsky B., Bozhkov P. V. 2011. Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death and Differ.* 18: 1241-1246.

- van Doorn W. G., Woltering E. J. 2005. Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends Plant Sci.* 10: 117-122.
- Esau K. 1965. *Plant anatomy*. Wiley, New York.
- Escamez S., Tuominen H. 2014. Programmes of cell death and autolysis in tracheary elements: when a suicidal cell arranges its own corpse removal. *J. Exp. Bot.* 65 (5): 1313-1321.
- Fukuda H. 1992. Tracheary element formation as a model system of cell differentiation. *Int. Rev. Cytol.* 136: 289-332.
- Fukuda H. 1996. Xylogenesis: initiation, progression, and cell death. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 299-325.
- Fukuda H. 1997. Programmed cell death during vascular system formation. *Cell Death and Differ.* 4: 684-688.
- Fukuda H. 2000. Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Mol. Biol.* 44: 245-253.
- Fukuda H., Watanabe Y., Kuriyama H., Aoyagi S., Sugiyama M., Yamamoto R., Demura T., Minami A. 1998. Programming of cell death during xylogenesis. *J. Plant Res.* 111: 253-256.
- Fukuda H., Yoshimura T., Sato Y., Demura T. 1993. Molecular mechanism of xylem differentiation. *J. Plant Res.* 3: 97-107.
- Funada R. 2000. Control of wood structure. W: Nick P. [red.]. *Plant microtubules: potential for biotechnology*. Springer, Heidelberg, 51-81.
- Funada R., Shibagaki M., Miura H., Abe H., Ohtani J. 2000. The role of cytoskeleton in secondary xylem differentiation in conifers. W: Savidge R., Barnett J., Napier R. [red.]. *Molecular and cell biology of wood formation*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, 255-264.
- Gartner B. L., Baker D. C., Spicer R. 2000. Distribution and vitality of xylem rays in relation to tree leaf area in Douglas-fir. *IAWA J.* 21: 389-401.
- Gorshkova T., Brutch N., Chabbert B., Deyholos M., Hayashi T., Lev-Yadun S., Mellerowicz E. J., Morvan C., Neutelings G., Pilate G. 2012. Plant fiber formation: state of the art, recent and expected progress, and open questions. *Critical Rev. Plant Sci.* 31 (3): 201-228.
- Greenberg J. T. 1996. Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 12094-12097.
- Groover A., Jones A. M. 1999. Tracheary element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. *Plant Physiol.* 119: 375-384.
- Havel L., Durzan D. J. 1996. Apoptosis in plants. *Bot. Acta* 109: 268-277.
- Hillis W. E. 1987. *Heartwood and tree exudates*. Springer, New York.
- Hirakawa Y., Kondo Y., Fukuda H. 2010. Regulation of vascular development by CLE peptide-receptor systems. *J. Integr. Plant Biol.* 52 (1): 8-16.
- Islam M. A., Begum S., Nakaba S., Funada R. 2012. Distribution and pattern of availability of storage starch and cell death of ray parenchyma cells of a conifer tree (*Larix kaemferi*). *Res. J. Recent Sci.* 1 (5): 28-37.
- Lev-Yadun S. 2010. Plant Fibers: Initiation, growth, model plants, and open questions. *Russ. J. Plant Physiol.* 57: 305-315.
- Magel E. 2000. *Biochemistry and physiology of heartwood formation*. W: Savidge R., Barnett J., Napier R. [red.]. Molecular and cell biology of wood formation. BIOS Scientific Publishers, Oxford, 363-376.
- Marty F. 1999. Plant vacuoles. *Plant Cell* 11: 587-599.
- Maruniewicz M., Wojtaszek P. 2007. Pochodzenie i ewolucja śmierci komórki. *Post. Biol. Kom.* 34 (4): 651-667.
- Motose H., Sugiyama M., Fukuda H. 2004. A proteoglycan mediates inductive interaction during plant vascular development. *Nature* 429: 873-878.
- Murakami Y., Funada R., Sano Y., Ohtani J. 1999. The differentiation of contact cells and isolation cells in the xylem ray parenchyma of *Populus maximowiczii*. *Ann. Bot.* 84: 429-435.
- Myburg A. A., Sederoff R. R. 2001. Xylem structure and function. *Encycl. Life Sci.* 1-9.
- Nabuchi T., Takahara S., Harada H. 1979. Studies on the survival rate of ray parenchyma cells with ageing process in coniferous secondary xylem. *Bull. Kyoto Univ. For.* 51: 239-246.
- Nakaba S., Begum S., Yamagishi Y., Jin H. O., Kubo T., Funada R. 2012a. Differences in the timing of cell death, differentiation and function among three different types of ray parenchyma cells in the hardwood *Populus sieboldii* × *P. grandidentata*. *Trees* 26: 743-750.
- Nakaba S., Kubo T., Funada R. 2008. Differences in patterns of cell death between ray parenchyma cells and ray tracheids in conifers *Pinus densiflora* and *Pinus rigida*. *Trees* 22: 623-630.
- Nakaba S., Sano Y., Kubo T., Funada R. 2006. The positional distribution of cell death of ray parenchyma in a conifer, *Abies sachalinensis*. *Plant Cell Rep.* 25: 1143-1148.
- Nakaba S., Yamagishi Y., Sano Y., Funada R. 2012b. Temporally and spatially controlled death of parenchyma cells is involved in heartwood formation in pith regions of branches of *Robinia pseudoacacia* var. *inermis*. *J. Wood Sci.* 58: 69-76.
- Obara K., Kuriyama H., Fukuda H. 2001. Direct evidence of active and rapid nuclear degradation triggered by vacuole rupture during programmed cell death in *Zinnia*. *Plant Physiol.* 125: 615-626.
- O'Brien T. P. 1970. Further observation on hydrolases of the cell wall in the xylem. *Protoplasma* 69: 1-14.
- Ohashi-Ito K., Oda Y., Fukuda H. 2010. Arabidopsis VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 directly regulates the genes that govern programmed cell death and secondary wall formation during xylem differentiation. *Plant Cell* 22: 3461-3473.

- Pennell R. I., Lamb C. 1997. Programmed cell death in plants. *Plant Cell*: 9: 1157-1168.
- Pesquet E., Zhang B., Gorzsás A., Puhakainen T., Serk H., Escamez S., Barbier O., Gerber L., Courtois-Moreau C., Alatalo E., Paulin L., Kangasjärvi J., Sundberg B., Goffner D., Tuominen H. 2013. Non-cell-autonomous postmortem lignification of tracheary elements in *Zinnia elegans*. *Plant Cell* 25: 1314-1328.
- Qiang Y., Wu J., Han H., Wang G. 2013. CLE peptides in vascular development. 55 (4): 389-94.
- Reape T. J., Molony E. M., McCabe P. F. 2008. Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. *J. Exp. Bot.* 59 (3): 435-444.
- Roberts K., McCann M. C. 2000. Xylogenesis: the birth of a corpse. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 517-522.
- Roberts L. W. 1976. Cytodifferentiation in plants. Xylogenesis as a model system. Cambridge University Press.
- Samuels A. L., Kaneda M., Rensing K. H. 2006. The cell biology of wood formation: from cambial divisions to mature secondary xylem. *Can. J. Bot.* 84: 631-639.
- Samuels A. L., Rensing K. H., Douglas C. J., Dharmawardhana D. P., Ellis B. E. 2002. Cellular machinery of wood production: differentiation of secondary xylem in *Pinus contorta* var. *latifolia*. *Planta* 216: 72-82.
- Sauter J. J., Kloth S. 1986. Plasmodesmal frequency and radial translocation rates in ray cells of poplar (*Populus × canadensis* Moench 'robusta'). *Planta* 168: 377-380.
- Smertenko A., Franklin-Tong V. E. 2011. Organisation and regulation of the cytoskeleton in plant programmed cell death. *Cell Death Differ.* 18: 1263-1270.
- Spicer R., Holbrook N. M. 2007. Parenchyma cell respiration and survival in secondary xylem: does metabolic activity decline with cell age? *Plant Cell Environ.* 30: 934-943.
- Thomas P. 2000. *Trees: Their natural history*. Cambridge University Press, USA.
- Turner S., Gallois P., Brown D. 2007. Tracheary element differentiation. *Ann. Rev. Plant Biol.* 58: 407-433.
- Williams B., Dickman M. 2008. Plant programmed cell death: can't live with it; can't live without it. *Mol. Plant Physiol.* 9 (4): 531-544.
- Wodzicki T. J. 1971. Mechanism of xylem differentiation in *Pinus sylvestris* L. *J. Exp. Bot.* 22: 670-687.
- Wodzicki T. J., Brown C. L. 1973. Organization and breakdown of the protoplast during maturation of pine tracheids. *Am. J. Bot.* 60 (7): 631-640.
- Wodzicki T. J., Humpherys W. J. 1972. Cytodifferentiation of maturing pine tracheids. The final stage. *Tissue Cell* 4 (2): 525-528.
- Zhang J., Nieminen K., Serra J. A. A., Helariutta Y. 2014. The formation of wood and its control. *Curr. Opin. Plant Biol.* 17: 56-63.