

URSZULA ZAJĄCZKOWSKA, MARCIN MALESA, MAŁGORZATA KUJAWIŃSKA

Zastosowanie metody filmowej do badań kinetyki grawitropicznej pędów w zmienionych warunkach grawimorficznych

Applying the time-lapse imaging technique for the studies of stem gravitropic kinetics in the changed gravimorphic conditions

ABSTRACT

Zajączkowska U., Malesa M., Kujawińska M. 2016. Zastosowanie metody filmowej do badań kinetyki grawitropicznej pędów w zmienionych warunkach grawimorficznych. Sylwan 160 (2): 120-126.

White willow (*Salix alba* L.) dormant shoots were collected in March and cut into 30 cm segments. The basal ends were placed in containers with sand and kept in dispersed sunlight and the halogen light after dark. To induce the gravimorphic reaction the segments were oriented at the angle of 30 degrees with respect to horizontal line (stage I). After two weeks of culture the segments were turned at the angle of 150 degrees in such a way that the segments were in horizontal position and the newly formed lateral shoots were oriented according to the gravity vector (fig. 1). They were kept in such position for another 2 weeks (stage II). The growth kinetics of newly formed shoots was studied using time lapse technique. It was found that during stage I the most intensive development of lateral buds growth occurred on the upper side at apical part of the shoot segment. During stage II, the newly formed shoots started to reorient opposite to the gravity vector. The lateral shoots close to the apical end responded faster as compared to the shoots located at farther distances. The site of gravitropic response during 2-week-long experiment was moving and located always below apical part of the lateral shoot in the non-lignified zone. Microscopic observations of the newly formed lateral shoots revealed formation of secondary xylem typical for willow and in some regions the structure newly formed xylem was similar to that of tension wood. The possibility of application of 3D digital Image Correlation method for the studies of growth trajectory was tested in the preliminary experiment performed on the seedlings of *Cucumis sativus* (fig. 2). The preliminary results (fig. 3) indicate that the method could be applied also for the of growth trajectory of woody plants.

KEY WORDS

gravitrophy, gravimorphy, growth kinetics, shoot regeneration, time-lapse imaging

ADDRESSES

Urszula Zajączkowska ⁽¹⁾ – e-mail: urszula.zajaczkowska@wl.sggw.pl

Marcin Malesa ⁽²⁾ – e-mail: m.malesa@mchtr.pw.edu.pl

Małgorzata Kujawińska ⁽²⁾ – e-mail: m.kujawinska@smarttech.pl

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

⁽²⁾ Zakład Inżynierii Fotonicznej, Politechnika Warszawska; ul. św. Andrzeja Boboli 8, 02-525 Warszawa

Wstęp

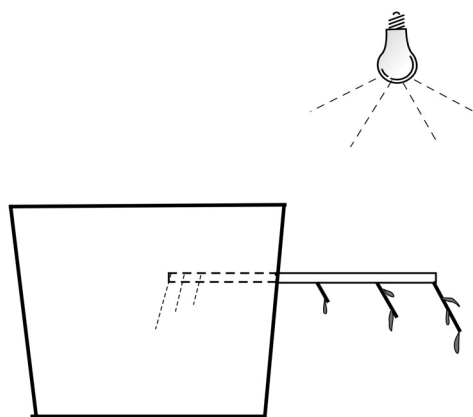
Wpływ pola grawitacyjnego na wzrost i różnicowanie się roślin jest przedmiotem badań od wielu lat i doczekał się licznych opracowań zarówno dla roślin naczyniowych, jak i mszaków [Wareing, Nasr 1958, 1961; Wagner, Sack 1998]. W badaniach efektów grawitacji na rośliny wyróżnia się dwa typy reakcji: grawitropizm i grawimorfizm. Grawitropizm oznacza ukierunkowany wzrost w polu grawitacyjnym, zgodnie lub przeciwnie w stosunku do zwrotu wektora przyspieszenia grawitacyjnego. Grawimorfizm dotyczy procesów na każdym poziomie organizacji i obejmuje szereg zjawisk morfologicznych w zależności od położenia w obrębie rośliny [Barlow 1995]. Za reakcję grawimorficzną uznaje się m.in. aktywację śpiących pąków bocznych z górnej strony odginanych pędów przy równoczesnym hamowaniu rozwoju pąków po spodniej stronie [Hyun-Hee i in. 2007] lub też ograniczony wzrost pędu wierzchołkowego i niższą aktywność kambium w łodydze po przechyleniu osi rośliny [Little, Lavigne 2002]. Orientacja przestrzenna pędów w rozgałęzionym drzewie i związany z tym swoisty typ wzrostu i rozwoju był też podstawą do opracowania wstępnych modeli wzorców rozgałęzień w koronie podczas ontogenezy drzewa [Renton i in. 2006]. Nie ma jednak dotychczas opracowań odpowiadających na pytanie, czy regulacja grawimorficzna, wyrażająca się określonym typem wzrostu, będzie miała wpływ na późniejszą reakcję grawitropiczną.

Metoda filmowa w technice poklatkowej od wielu lat jest stosowana w analizie wzrostu i rozwoju roślin [Spurný 1976]. Główną zaletą tej analizy jest możliwość monitoringu zjawisk, które dokonują się w długim okresie czasu i z tego powodu są praktycznie niemożliwe do bezpośredniej obserwacji. Zarejestrowanie zdarzenia odbywa się przez zapisanie pojedynczej klatki w określonym interwale (zakres zwykle od 10 sekund do kilku godzin – w zależności od zjawiska) oraz zmontowanie poszczególnych klatek do postaci filmu odtwarzanego z określoną prędkością.

Celem niniejszej pracy była próba zastosowania metody filmowej do analizy zjawiska grawitropizmu ujemnego pędów wierzby białej zastymulowanych i ukształtowanych poprzez zjawisko grawimorfizmu. Podjęto też badania metodyczne nad możliwością zastosowania nowoczesnych metod 3D cyfrowej korelacji obrazu (3D CKO) do szczegółowych badań trajektorii wzrostu rośliny. Tę część badań eksperymentalnych, ze względu na ich wstępny charakter i konieczność zastosowania możliwie bardzo prostego modelu roślinnego, wykonano na siewkach ogórka.

Materiał i metody

EKSPERYMENT 1. Badania przeprowadzono na rocznych pędach wierzby białej (*Salix alba* L.). Pędy w stanie bezlistnym zebrano na początku marca i przechowywano przez okres około 1 miesiąca w temperaturze 5°C w celu zahamowania rozwoju pąków, następnie dzielono je na odcinki o długości 30 cm. Doświadczenie przeprowadzono w dwóch etapach. Etap I obejmował hodowlę odcinków pędów w celu uzyskania reakcji grawimorficznej. W celu aktywacji pąków i wzrostu nowych pędów bocznych (do długości około 12 cm) odcinki pędów ułożono ukośnie – pod kątem 30° do poziomu, końcem bazalnym w kuwecie wypełnionej wilgotnym piaskiem, na około 2 tygodnie. Etap II polegał na hodowli nowych pędów utworzonych w etapie I. Odcinki pędów obrócono o 150°, tak aby nowo utworzone pędy boczne ustawione były zgodnie ze zwrotem wektora grawitacji. Pędy umieszczono w pojemnikach wypełnionych wilgotnym piachem z dodatkiem hydrożelu (w celu zatrzymania wilgoci). Bazalne końce odcinków pędów z wytworzonymi korzeniami były zagłębione w piachu, a pozostała część, z wyrosniętymi, nowymi pędami, wystawała z pojemnika (ryc. 1). Okres wzrostu wyniósł 2 tygodnie.



Ryc. 1.

Schemat eksperymentu ze zrazami (odcinkami pędów) wierzby białej – początek etapu II. Pędy boczne utworzone w etapie I ustawione zgodnie ze zwrotem wektora grawitacji

Scheme of the experiment with white willow stem segments – the beginning of stage II. Lateral shoots formed during the stage I were positioned according to gravity vector

W obydwu etapach hodowla prowadzona była w pomieszczeniu z dostępem do rozproszonego światła dziennego i światła halogenowego w okresie nocy. W drugim etapie badań reakcję nowych pędów na zmianę położenia rejestrowano poklatkową techniką filmową, używając do tego celu kamery DV Sony VX2100 oraz aparatów cyfrowych: Pentax K10 oraz Ricoh GX200. Ustawiona wartość interwału to 1 klatka co 30 minut. Uzyskany materiał cyfrowy poddano montażowi w programie Final Cut Pro 6 w celu uzyskania filmu o prędkości 25 klatek/sek.

Po 14 dniach obserwacji, po zakończeniu etapu II, wyrośnięte pędy zebrano i poddano badaniom mikroskopowym. Preparaty wykonano na przekrojach poprzecznych w trzech miejscach pędu powstałych w trzech okresach wzrostu:

- 1) podczas etapu I w rejonie niepodlegającym wygięciu grawitropicznemu (średnio 1 cm od podstawy nowo utworzonego pędu),
- 2) podczas etapu I, w rejonie podlegającym intensywnemu wygięciu grawitropicznemu,
- 3) podczas etapu II, w rejonie niepodlegającym wygięciu (orientacja osi zgodna z wektorem grawitacji).

Preparaty cięto skalpelem i zamykano w glicerynie. Obserwacje wykonano mikroskopem optycznym Olympus bazującym na oprogramowaniu Cell P.

EKSPERYMENT 2. Wstępne badania metodyczne dotyczące trajektorii wzrostu roślin wykonano na siewkach ogórka siewnego (*Cucumis sativus* L.). Ich celem było sprawdzenie możliwości zastosowania metody 3D cyfrowej korelacji obrazu do badań trajektorii wzrostu roślin. Badania wykonano na podlegających reakcji grawitropicznej siewkach ogórka o długości kilku cm, w których wykształcone były liścienie oraz nastąpił początek rozwoju pierwszych liści (ryc. 2). Układ 3D CKO składał się z dwóch aparatów cyfrowych Canon EOS 5D Mark2 o rozdzielczości 21 Mpx wyposażonych w obiektywy o stałej ogniskowej 24 mm. Przed rozpoczęciem pomiarów układ 3D CKO skalibrowano, wykonując serie zdjęć dwóch plansz kalibracyjnych (czarne okręgi na białym tle oraz szachownica). Test trwał łącznie około 70 godzin, a dane zbierane były z interwałem 10 minut. Zarejestrowano łącznie około 450 zdjęć.

Wyniki

EKSPERYMENT 1. Podczas pierwszego etapu hodowli pędów wierzby wyrastających ze zrazów ułożonych ukosem (pod kątem 30°) zaobserwowano reakcję grawimorficzną, wyrażającą się nierównomierną aktywacją pąków i zróżnicowaną intensywnością wzrostu nowych pędów. Najbardziej



Ryc. 2.

Widok siewki ogórka badanej z dwóch aparatów fotograficznych układu 3D cyfrowej korelacji obrazu z zaznaczonym punktem analizy (P1)

View of the cucumber seedling analyzed with two cameras of 3D Digital Image Correlation system with point for growth trajectory analysis (P1)

intensywnie rosły pędy z pąków przy szczycie zrazu (przy końcu apikalnym) i po górnej jego stronie. W dalszej analizie określono je jako pędy „A”. Wraz ze wzrostem odległości od szczytu zrazu malała długość nowo powstałych pędów – określono je jako pędy „B”. Długość nowo utworzonych pędów zawierała się w przedziale 1-12 cm, a grubość w granicach 3-6 mm. W strefie zrazu znajdującej się w podłożu wykształciły się korzenie, które najintensywniej rosły na dolnym (bazalnym) końcu zrazu i po spodniej jego stronie.

Analiza kinematograficzna wykazała, że nowo utworzone pędy, ustawione zgodnie z wektorem grawitacji, w okresie 7 dni podlegały wygięciu grawitropicznemu, którego kąt wynosił średnio 150°. Ustawienie to było ostateczne i przeciwne do zwrotu wektora grawitacji. Pędy „A” w większości przypadków reagowały jako pierwsze już od pierwszego dnia po rozpoczęciu doświadczenia. Pędy „B” rozpoczęły reakcję wzrostową średnio po upływie 24 godzin w stosunku do pędów „A”. Zaobserwowano również ruchy nutacyjne, które ujawniały się dopiero po osiągnięciu przez nowo tworzony pęd orientacji pionowej.

Strefa pędu, w której występuje ugięcie grawitropiczne, jest także miejscem, gdzie pęd ulega zgięciom nutacyjnym. Miejsce to podnosi się wraz ze wzrostem wydłużeniowym pędu i przemieszcza się w kierunku apikalnym, występując ciągle w strefie niezdrewniałej pod wierzchołkiem.

Strefy pędów powstałych podczas etapu I, kiedy pędy nie podlegały wygięciu, charakteryzują się dwoma różnymi typami wzrostu. W większości przypadków kambium wytworzyło w kierunku promieniowym od 3 do 10 komórek drewna, które odkładane były nierównomiernie na obwodzie. Wyrażało się to falistą granicą między nowo utworzonym drewnem a miękiszem rdzeniowym. Zaobserwowano także intensywne podziały miękiszu rdzeniowego, co powodowało przyrost pędu na grubość. Średnie wartości średnicy miękiszu wyniosły 2200 i 4350 μm dla stref pędu powstałych odpowiednio po pierwszym i drugim etapie. W dwóch przypadkach zarejestrowano jednak odmienną formę wzrostu, charakteryzującą się bardzo intensywnym przyrostem na grubość przez tworzenie komórek drewna (średnio 37 komórek w kierunku promieniowym) przy równoczesnej małej grubości warstwy miękiszu rdzeniowego.

W reakcji anatomicznej pędu na zmienione warunki wzrostu można zaobserwować tworzenie się pewnych charakterystycznych struktur. Zaobserwowana wcześniej (w etapie I) falistość granicy między drewnem a miękiszem rdzenia jest najbardziej widoczna w obszarze, gdzie zmieniający swoją pozycję pęd ulegał ścisnaniu, bez specyficznych zmian w strefie rozciągania pędu. Dodatkowo w strefach tych obszar drewna różni się znacznie od rejonów pędu w kierunku

bazalnym, oddalonych o około 90° wartości kątowej. Zaobserwowano tam rzędy ukośnie ułożonych komórek o charakterze drewna tensyjnego. Cechą charakterystyczną jest tu również kształt pędu na przekroju poprzecznym. Całkowity obrys obwodu pędu ma kształt eliptyczny, z dłuższą średnicą leżącą w kierunku pionowym.

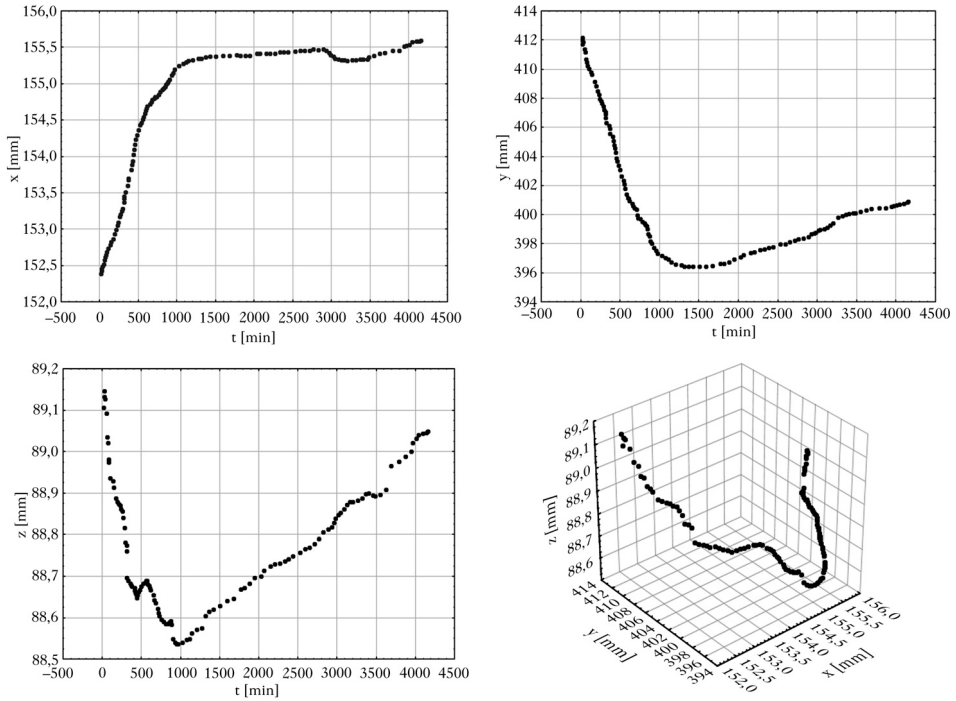
EKSPERYMENT 2. Badania metodyczne z zastosowaniem metody 3D CKO wykonane na prostym obiekcie roślinnym – siewkach ogórka (ryc. 2) wykazały, że technika ta w standardowej formie nie dała oczekiwanych rezultatów. Problem pojawił się w związku z identyfikacją obszarów z lewej i prawej kamery. Kształt liści oraz ułożenie łodyg sprawiały, że zdjęcia roślin z lewej i prawej kamery zbyt szybko się od siebie różniły, a rozwiązanie „correspondence problem” stanowi podstawę do wyznaczenia współrzędnych 3D badanego obiektu. Zastosowano więc analizę serii pomiarowej w dwóch układach 2D CKO (z lewej i prawej kamery) z użyciem tzw. analizy inkrementalnej, w której każdy obraz serii pomiarowej stanowił obraz referencyjny dla kolejnego obrazu. Dzięki tej procedurze wyznaczono trajektorię punktu P1 (odpowiadającego wierzchołkowi wzrostu łodygi) dla lewej i prawej kamery. Do współrzędnych punktu startowego analizy dodawano wynik pomiaru przemieszczeń związanych ze wzrostem. Następnie ręcznie zaznaczano odpowiadający punkt na zdjęciu z lewej i prawej kamery. Kalibracja układu 3D CKO oraz współrzędne punktu P1 z lewej i prawej kamery pozwoliły na wyznaczenie punktu P1 w rzeczywistym układzie współrzędnych 3D.

Uzyskane za pośrednictwem takiej procedury wyniki dotyczące trajektorii wzrostu wierzchołka (P1) przedstawiono na wykresach oddzielnie na osiach x, y i z w funkcji czasu oraz w rzeczywistym układzie współrzędnych 3D (ryc. 3). Zaprezentowane na wykresach wyniki wskazują, że zastosowana metoda pozwoliła na odtworzenie przebiegu wzrostu wierzchołka łodygi w postaci trajektorii o charakterze linii ciągłych, co wskazuje na wysoki stopień odwzorowania procesów wzrostowych w pędach wykazujących reakcję grawitropiczną. W przebiegu tych trajektorii obserwuje się też lokalnie nieznaczne oscylacje, szczególnie wyraźne na osi z.

Dyskusja

Podczas etapu I, tj. w czasie hodowli pędów ze zrazów ułożonych ukośnie, efekt grawimorficzny był typowy dla tego typu formy wzrostowej, obserwowanej przez wielu badaczy [Wareing, Nasr 1961; Timell 1986; Little, Lavigne 2002]. Traktowany był jako etap wstępny w doświadczeniu, które dotyczyło głównie późniejszej reakcji utworzonych w ten sposób pędów na pole grawitacyjne (etap II). Jak wykazały obserwacje filmów, istnieje istotne opóźnienie w rozpoczęciu reakcji prostowania odwróconych pędów. Być może związane jest to z faktem, że pędy krótsze, ułożone dalej od wierzchołka zrazu, znajdują się pod wpływem dominacji wierzchołkowej pędów dłuższych, usytuowanych bliżej końca apikalnego, która związana jest z hamującym efektem transportowanej polarnie auksyny. Little i Lavigne [2002], odginając pęd główny jodły balsamicznej (*Abies balsamea*), zarejestrowali słabszy puls przepływu auksyny z odchylnego pąka wierzchołkowego oraz intensywne odkładanie drewna kompresyjnego na spodniej stronie pnia. Zasugerowali, że w tych rejonach wytworzyła się swoista zlewnia („sink”) dla auksyny, co było już odnotowane przez innych autorów [Wareing, Nasr 1961].

Fakt opóźnionej reakcji grawitropicznej w pędach bardziej odległych od końca apikalnego, charakteryzujących się zahamowanym wcześniej wzrostem, dostarcza wielu pytań i wymaga dalszych doświadczeń. Być może nie był brany pod uwagę w dostatecznym stopniu parametr czasu, który w morfogenezie roślin odgrywa istotną rolę. Pojawia się zatem pytanie, czy geometria roślin determinowana jest nie tylko przez dynamikę systemów hormonalnych, ale również przez endogenne specyficzne zegary, który indukowalby do wzrostu określone pąki.



Ryc. 3.

Trajektorie wzrostu wierzchołkowej części pędu siewki ogórka przedstawione w funkcji czasu oddzielnie na osiach x, y i z oraz 3-wymiarowym układzie współrzędnych

Growth trajectories of stem apical part of cucumber seedling presented as the function of time separately for x, y and z axes, and in 3-D coordinate system

Wykonane w ramach niniejszych badań wstępne pomiary metodyczne dotyczące trajektorii wzrostu łodygi młodej siewki ogórka z zastosowaniem metody 3D cyfrowej korelacji obrazu wskazują, że technika ta może być wykorzystana do szczegółowych badań dynamiki i geometrii wzrostu roślin drzewiastych poddanych reakcji grawimorficznej. Jak się wydaje, zaobserwowane trudności metodyczne można w znacznym stopniu pokonać, wykonując analizę korelacyjną oddzielnie dla lewej i prawej kamery w trybie 2D oraz wybierając do tej analizy punkty referencyjne w taki sposób, by można je było zastosować do korelacji. Obecne wyniki pozwalają przypuszczać, że wprowadzenie tej techniki badawczej może ujawnić zupełnie nowe aspekty dotyczące dynamiki i geometrii wzrostu roślin drzewiastych w procesach adaptacji nie tylko do grawitacji, lecz także do innych zmienionych warunków środowiskowych.

Literatura

- Barlow P. W. 1995. Gravity perception in plants: a multiplicity of systems derived by evolution? *Plant, Cell & Environment* 18 (9): 951-962.
- Hyun-Hee H., Coutand C., Cochard H., Trottier C., Lauri P. E. 2007. Effects of shoot bending on lateral fate and hydraulics: invariant and changing traits across five apple genotypes. *Journal of Experimental Botany* 58 (13): 3537-3547.
- Little C., Lavigne M. B. 2002. Gravitropism in current-year shoots of abies balsamea: Involvement of compensatory growth, indole-3-acetic acid transport and compression wood formation. *Tree Physiology* 22 (5): 311-320.
- Renton M., Guédon Y., Godin C., Costes E. 2006. Similarities and gradients in growth unit branching patterns during ontogeny in 'Fuji' apple trees: a stochastic approach. *Journal of Experimental Botany* 57 (12): 3131-3143.

- Spurný M.** 1976. Nutation rhythm of growing pine hypocotyl (*Pinus silvestris* L.) interferred with phototropic stimulus. *Biologia Plantarum* 18 (4): 251-259.
- Timell T. E.** 1986. Compression wood in conifers. Vol. 1-3. Springer-Verlag, Berlin.
- Wagner T. A., Sack F. D.** 1998. Gravitropism and gravimorphism during regeneration from protoplasts of the moss *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. *Planta* 205 (3): 352-358 .
- Wareing P. F., Nasr T. A. A.** 1958. Gravimorphism in trees. *Nature* 182: 379-380.
- Wareing P. F., Nasr T. A. A.** 1961. Gravimorphism in trees. I. Effects of gravity on growth and apical dominance in fruit trees. *Annals of Botany* 25 (3): 321-340.