



## Czas jako czynnik wzrostu i rozwoju roślin nie tylko w kulturach *in vitro*

Franciszek Dubert<sup>1,2</sup>, Agnieszka Płażek<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instytut Fizjologii Roślin, Polska Akademia Nauk, Kraków

<sup>2</sup> Katedra Fizjologii Roślin, Akademia Rolnicza, Kraków

### Time as a growth and development factor of plants not only in *in vitro* cultures

#### Summary

The paper deals with time as a physical (space-time coordinate with specific properties and measure methods) as well as biological concept. Biological time is running differently taking in account various organizational levels like cell, cell organelles, whole organism and, finally, population or species. Time is a factor that regulates plant ontogenesis. In many plant species, time regulates seed dormancy and plant vernalization, photoperiodism and circadian rhythms. Time sets in motion the "biological clock" which controls physiological and biochemical processes in plant, particularly the rate of enzymatic reactions, oscillation processes (circadian or annual rhythms), as well as internal "cell clock" deciding upon the length of cell life as well as the rate of cell ageing processes. Senescence or death of particular cells do not mean death of the whole organism. In numerous plant species, death of individual cell is even a factor determining survival of the whole plant. The plant senescence is regulated by phytohormones such as abscisic acid, cytokinins or auxins. Time gathers new meaning in *in vitro* cultures. It may differ with respect to stable cell suspension culture in many cases maintaining an ability for cell multiplication for many years as compared to another fast regenerating cultures. The influence of various stress factors under *in vitro* conditions enables the "switching on" the clock controlling the processes of cell multiplication and differentiation.

#### Key words:

biological clock, differentiation, induction of flowering, measurement of time, plant hormones, senescence, stress *in vitro*.

#### Adres do korespondencji

Franciszek Dubert,  
Instytut Fizjologii Roślin,  
Polska Akademia Nauk,  
ul. Niezapominajek 21,  
30-239 Kraków;  
e-mail:  
f.dubert@ifr-pan.krakow.pl

## 1. Wstęp

Przedmiotem rozważań zawartych w tym artykule jest czas. Czas jest frapujący nie tylko jako pojęcie fizyczne, ale również jako określenie długości trwania życia jedno- i wielokomórkowych organizmów roślin i zwierząt oraz ludzi. Czas kojarzy się często jako czynnik destrukcyjny, zbliżający każdy organizm do nieuchronnej śmierci, ale przecież czas to czynnik wpływający przede wszystkim na inicjację życia, jego rozwój i dojrzewanie. Czas występujący razem z innymi czynnikami stresowymi indukuje najrozmaitsze reakcje organizmów, a w przypadku roślin wymusza odpowiedź zarówno pojedynczych komórek hodowanych *in vitro*, jak również całej rośliny.

### 1.1. Czas jako pojęcie fizyczne

Czas jest jednym z czterech podstawowych wymiarów czasoprzestrzeni. Dla lokalizacji jakiegoś zdarzenia należy bowiem podać trzy współrzędne  $X$ ,  $Y$  i  $Z$  określające jego położenie w przestrzeni oraz czas jako współrzędną określającą moment, w którym zdarzenie to nastąpiło. Zmienna czasowa różni się jednak od zmiennych przestrzennych, ponieważ, o ile można określić nieruchomy w przestrzeni punkt  $A$  o współrzędnych  $A_x$ ,  $A_y$  i  $A_z$ , a nawet można przesuwać ten punkt w kierunku początku układu, to wartość zmiennej czasowej powiększa się ze stałą prędkością, co nazywamy upływem czasu. Nie można zatem (przynajmniej wg obecnego stanu wiedzy i w warunkach, w których życie byłoby możliwe), zatrzymać czasu ani go cofnąć, na przykład do początku czasu i wszechświata. Pomiaru czasu dokonuje się zazwyczaj poprzez wyznaczenie liczby pewnych cyklicznych zdarzeń, jak liczba uderzeń serca (pomiar stosowany przez starożytnych Greków), przesypywanie piasku w klepsydrze, ruch wahadła, a ostatnio oscylacje atomów. Im częstsze są oscylacje będące podstawą działania zegara, tym dokładniej można mierzyć czas. Stąd też zegar oparty na pomiarze oscylacji atomów wykazuje maksymalny błąd dobowy nie przekraczający 1 miliardowej sekundy, co oznacza, że skumulowany błąd wielkości 1 minuty nastąpi po około 165 mln lat.

Czas jako jedna z czterech zmiennych jest z pozostałymi związany w sposób opisany przez szczególną teorię względności Einsteina. Wynikają z niej paradoksy takie, jak niemożność przekroczenia przez obiekty materialne prędkości światła, niemożność arytmetycznego dodawania prędkości, czy spowolnienie czasu w obiektach poruszających się względem siebie. Podobno Einstein, poproszony kiedyś przez młodą dziennikarkę o wyjaśnienie w prostych słowach zasady względności czasu stwierdził, że godzina w parku spędzona z kobietą mija jak minuta, a minuta siedzenia na gorącym piecu dłuży się jak godzina.



## 1.2. Oś czasu z wybranymi kamieniami milowymi

Teoretycznie, skala czasu obejmuje około 61 rzędów, ponieważ najkrótszy odcinek czasu, tzw. czas Plancka wynosi  $10^{-43}$  sekundy, natomiast najdłuższy z możliwych odcinków czasu stanowi wiek wszechświata, czyli czas od wielkiego wybuchu do chwili obecnej szacowany jest na 14 do 20 mld lat, tj. około  $6 \times 10^{17}$  sekund. Wszystkie inne wydarzenia mieszczą się wewnątrz tego maksymalnego przedziału czasowego.

Do najważniejszych wydarzeń kosmicznych, jak również w skali ziemskiej można zaliczyć powstanie naszej galaktyki (około 10 mld lat temu), czy naszego układu słonecznego (4,5 mld lat), pojawienie się życia na Ziemi (około 2 mld lat), pojawienie się rodzaju *Homo* (2-2,5 mln lat), ukształtowanie się wyglądu ludzi podobnego do współczesnego (120 tys. lat), czy przywędrowanie człowieka do Europy (40 tys. lat).

## 2. Czas życia obiektów biologicznych

Czas może stanowić miarę długości trwania gatunku, mierzony od ewolucyjnego wyodrębnienia do wyginięcia lub do chwili obecnej, a w jego obrębie można wyróżnić czas życia lokalnych populacji. Czas w skali indywidualnego organizmu określa okres od jego narodzin do śmierci. Niektórym pustynnym drzewom przypisuje się maksymalny wiek nawet ponad 20 tys. lat, długość życia sekwoi kalifornijskiej określa się na 2 do 4000 lat, długość życia żółwia morskiego ok. 200 lat, słonia kilkadziesiąt lat, a jętki jednodniówki – przysłowiowy 1 dzień.

Według hipotezy telomerowej długość życia organizmu jest zakodowana genetycznie poprzez tzw. licznik liczby mitoz od stadium zygoty. Replikaza DNA nie może bowiem prowadzić tego procesu „wizując” niejako w powietrzu, a z kolei, jeśli jest przytwierdzona na końcu cząsteczki DNA, to tego końca nie może zreplikować. Stąd też według tej hipotezy w trakcie kolejnych mitoz cząsteczki DNA są systematycznie skracane na końcach, czyli od strony telomerów. Powoduje to, że po przekroczeniu pewnej liczby mitoz komórka traci zdolność do dalszych podziałów. Cały, nawet bardzo duży organizm, pochodzi z zapłodnionej komórki jajowej, która w tym celu odbyła pewną liczbę podziałów. W miarę jak w organizmie gromadzą się komórki, których licznik telomerowy zbliża się do wartości granicznej, organizm ten starzeje się i zbliża do śmierci. W tym sensie liczba zakodowanych mitoz mogłaby stanowić ową hipotetyczną, genetycznie zapisaną długość życia organizmów danego gatunku, zakładając, że długość cyklu komórkowego, czyli odstęp czasu pomiędzy kolejnymi mitozami jest też w jakiś sposób genetycznie kodowany.

Określenie czasu życia komórki nastrocza problemy. Jak bowiem go liczyć? Jeśli przyjąć, że mitoz nie oznacza przerwania ciągłości życia tylko jest kontynuacją życia komórki matecznej przez komórki potomne, to należałoby przyjąć skumulowany



wiek wszystkich komórek, które ewolucyjnie ją poprzedziły. Czas życia każdej komórki byłby zatem równy okresowi, jaki upłynął od wykształcenia się pierwszych organizmów jednokomórkowych. Alternatywą jest przyjęcie, że wiek komórki liczy się jako czas upływający od końca mitozy, w której ta komórka powstała. Tak liczony czas życia komórek jest bardzo zróżnicowany – od wielu lat dla komórek zlokalizowanych w pobliżu powierzchni pnia drzewa, ale nie powstałych w wyniku działania kambium, lub neurytów w tkance nerwowej u zwierząt w podeszłym wieku do szybko dzielących się komórek w merystemach wierzchołkowych, czy w nabłonkach.

Czas życia organelli komórkowych może być albo równy czasowi życia komórki, jak to jest w przypadku jądra komórkowego, albo częściowo z nim skorelowany, jak to jest w przypadku autonomicznych pod tym względem chloroplastów i mitochondriów.

### 3. „Czas życia” innych obiektów

Czas życia różnych cząsteczek jest niezwykle zróżnicowany. Wśród izotopów radioaktywnych można wymienić  $\text{Lw}^{257}$  z okresem półtrwania 8 sec,  $\text{Rn}$  – 3,8 dnia,  $\text{P}^{32}$  – 14 dni,  $\text{T}$  – 12,5 roku,  $\text{Ra}$  – 1590 lat,  $\text{C}^{14}$  – 4700 lat,  $\text{Pu}^{239}$  – 24 000 lat czy  $\text{U}^{238}$  – 4,5 mld lat. Z zestawienia tego wynika dlaczego właśnie radioaktywny węgiel zrobił taką karierę w archeologii. Dla porównania czas trwania niektórych cząstek elementarnych: mezonu  $\mu$  –  $10^{-6}$  sec czy mezonu  $\pi$  –  $10^{-15}$  sec.

Przeanalizujmy czas życia różnych molekuł komórkowych. Molekuły DNA żyją długo, przynajmniej przez okres od mitozy do mitozy, tylko, że w wyniku replikacji mamy wówczas cząsteczki w połowie stare, a w połowie nowe. Trudno zatem zdefiniować dokładnie, jak rozumieć czas życia DNA. RNA żyje krótko – zwłaszcza mRNA, który żyje dopóty, dopóki jest związany z rybosomami, bo to oznacza, że jest zapotrzebowanie w komórce na kodowane przezeń białko. Jeśli zapotrzebowanie na to białko wygaśnie kompleks mRNA–rybosom rozpada się, a nukleazy rozcinają „uwolniony” mRNA na fragmenty, kończąc tym samym jego żywot. Z kolei w przypadku enzymów ich liczba obrotowa mieści się w przedziale ponad czterech rzędów wartości, w zakresie 100 – 3 000 000/sec. Wynika stąd, że czas pojedynczego cyklu katalitycznego wynosi od 10 000 do 0,3 mikrosekundy, przy czym do „najpowolniejszych” enzymów należą replikaza DNA oraz Rubisco, czyli oksygenaza/karboksylaza RuDP, a do najszybszych katalaza. Czas życia molekuł białkowych jest trudny do wyznaczenia. Niektóre „agresywne enzymy”, np. trypsyna lub pepsyna, syntetyzowane są jako nieaktywne prekursorzy. Wówczas ich czas życia rozpoczyna się z chwilą przejścia w formę aktywną, a kończy wtedy, kiedy enzym traci aktywność w wyniku, przykładowo, zmiany środowiska w następnym odcinku układu pokarmowego.



#### 4. Problem wieku roślinnych organizmów wielokomórkowych

U organizmów wielokomórkowych można wprowadzić pojęcie „czasu ogólnego” i „lokalnego”. Przez „czas ogólny” rozumiemy okres np. od wysiewu nasion lub w kulturach *in vitro* od otrzymania regeneratów do chwili obecnej. Natomiast czas „lokalny” to wiek poszczególnych organów w obrębie jednego organizmu. Specyfiką roślin jest to, że w odróżnieniu od zwierząt rosną przez całe życie. Później wytworzone organy są młodsze od wykształconych wcześniej. Jest to szczególnie widoczne w momencie wchodzenia rośliny w fazę generatywną. Składa się ona wówczas z organów wytworzonych jeszcze w okresie wegetatywnym i młodszych organów generatywnych. W przypadku wieloletnich drzew, na tle starzejącego się pnia i konarów występują jednosezonowe liście i owoce. U motylkowatych, np. u bobiku sytuacja komplikuje się jeszcze bardziej, ponieważ idąc od dołu w górę łodygi, napotykamy strefy coraz młodsze – od najstarszej leżącej pod strefą owocowania, poprzez generatywną z niemal dojrzałymi strąkami, generatywną z napełniającymi się nasionami, młodą generatywną z młodymi strąkami, które przetrwały okres odpadania, młodszą ze świeżo zawiązanymi strąkami (jeszcze nie wiadomo, które z nich odpadną), jeszcze młodszą z kwiatami, najmłodszą generatywną z pąkami kwiatowymi i najwyższą, tak młodą, że jeszcze wegetatywną. Każde piętro rośliny ma zatem charakterystyczny dla siebie wiek i fazę rozwojową. W trakcie wegetacji granice poszczególnych faz przemieszczają się w górę łodygi.

Innym zagadnieniem jest, czy roślina rozmnaża się generatywnie tylko jeden jedyny raz w życiu, czy też proces ten się powtarza. Krótko mówiąc, chodzi o to, czy istnieje możliwość „resetowania” wewnętrznego zegara rośliny i uruchamiania go na nowo, czy też zegar raz włączony „idzie wciąż naprzód” i wyznacza koniec życia rośliny. Wieloletnie rośliny mają zwykle możliwość restartu zegara i rozpoczynania na nowo fazy generatywnej, choć z wyjątkami takimi, jak agawa, czy niektóre bambusy, które wchodzi w fazę generatywną tylko raz w życiu, po wielu latach fazy wegetatywnej.

Istnieje jeszcze jedna trudność w ustaleniu relacji pomiędzy wiekiem organizmu a wiekiem jego składowych komórek. Trwanie organizmu jest bowiem stale okupowane śmiercią mnóstwa komórek. Wiele komórek musi umrzeć, aby organizm kontynuował życie. Są to pojedyncze komórki, które umierają w procesie apoptozy, czyli programowanej śmierci komórek. Komórki te nie umierają z powodu letalnego defektu, ale dla nadrzędnego celu, jakim jest rozwój organizmu. To dzięki apoptozie nasze dłonie mają wykształcone palce. W rozwoju zarodkowym każdego z nas pewna liczba komórek umarła po to, by poszczególne palce mogły się rozdzielić. Gdyby nie to, mielibyśmy dłonie biologicznie gotowe do gry w tenisa stołowego bez dodatkowego sprzętu. Na mechanizmie apoptozy opiera się proces nabywania przez organizmy końcowego kształtu poszczególnych organów. Trochę podobieństwa wykazuje reakcja nadwrażliwości (ang. *hypersensitive response*). Jest to jeden z mechanizmów obronnych roślin przeciwko patogenom (1,2). Polega on na tym, że po ataku patogena do komórek otaczających miejsce ataku wysyłany jest sygnał ak-



tywujący geny kodujące bardzo aktywne enzymy hydrolityczne. Uśmiercają one własną komórkę poprzez rozkład jej głównych składników. Mikroorganizm penetrujący tkankę rośliny zostaje zatem otoczony pierścieniem komórek martwych, których ściana komórkowa wysycona suberyną i ligniną staje się barierą odgradzającą pasożyta od wody i asymilatów, prowadząc do jego śmierci. U roślin można pokazać jeszcze bardziej drastyczny proces. Niektóre komórki, takie jak elementy naczyń, sklerenchymy, czy okrywającej tkanki kory stają się dla całego organizmu życiowo ważne dopiero, wtedy gdy same zakończą żywot, przekształcając się np. w ścianki naczyń ksylemu. Również erytrocyty stają się dla nas życiowo ważne dopiero, gdy zaniknie w nich jądro komórkowe. Rośliny okresowo odrzucają duże części swoich organów naziemnych – jest to masowy pogrom już nie pojedynczych komórek ani organów, ale dużych partii roślin, często stanowiących około 80% masy całej rośliny. Takie odrzucanie organów jest konieczne dla rozpoczęcia po raz kolejny fazy generatywnej. Przykładowo, jabłonie uprawiane w ciepłym i wilgotnym klimacie, gdzie nie ma warunków do odpadania suchych liści, nie będą owocowały zanim im ręcznie czy mechanicznie nie oberwiemy liści.

Jaka jest główna różnica związana z czasem pomiędzy komórkami somatycznymi i generatywnymi? Otóż, o ile nawet aktualny wiek obydwu typów komórek może być zbliżony, jako że wszystkie one wywodzą się od pierwszych „prakomórek”, o tyle inaczej zupełnie wygląda sprawa z czasem życia liczonemu od chwili obecnej w przód. Komórki somatyczne umierają razem z całym organizmem, podczas gdy nieliczne gamety, którym było dane utworzyć nowy organizm, żyją w nim nadal, po śmierci ich organizmu macierzystego. W tym nowym organizmie, znowu nieliczne mają szansę rozwinąć się w gamety i dać początek nowemu organizmowi. Tym sposobem linia komórek gametycznych staje się nieśmiertelna i trwa w kolejnych pokoleniach, a na czas każdego z nich otrzymuje nową otoczkę z okresowych komórek somatycznych. Oczywiście, nie chcemy nikomu sprawić przykrości twierdzeniem, że jest on tylko tymczasową otoczką dla swoich gamet. Każdy organizm jest bowiem spadkobiercą niewyobrażalnie wielu pokoleń organizmów, które go poprzedziły ewolucyjnie, także tych najprostszych. Ten szereg ewolucyjny przodków każdego z żyjących organizmów ma tę specyficzną cechę, że jest to ciąg tylko tych organizmów, które odniosły sukces ewolucyjny i wydały potomstwo, zanim same zakończyły żywot. Oznacza to, że biologicznym celem każdego organizmu jest starać się przedłużyć ten ciąg, aby to właśnie na nim ów wielomiliardowy ciąg „organizmów-szczęściarzy” się nie zakończył.

## 5. Czas jako czynnik regulujący ontogenezę rośliny

Zagadnienie regulacji ontogenezy ma wielorakie podłoże. Możemy je rozumieć jako ciągły pomiar upływającego czasu lub też czas mierzony liczbą pewnych oscylacji. W pierwszym przypadku możemy rozumieć czas jako ciągłą zmienną, której po-



stęp umożliwia powstawanie nowych organów, np. pięter łądygi. Ich liczba w pewnym momencie osiąga wartość, która stanowi sygnał do rozpoczęcia fazy generatywnej. Czy można roślinę oszukać, czyli zasugerować jej inny czas? Czasami usunięcie liści jest sposobem na przyspieszenie kwitnienia. Podobnie, jeśli uda się ukorzeńić odcięty pęd ze starszego krzewu lub drzewa, często bywa tak, że ta sadzonka rozwija się w roślinę kwitnącą szybciej aniżeli inna roślina podobnej wielkości, tyle że wyrosła z nasiona. W ramach wcześniejszych badań (badania własne, nie publikowane) przeprowadzono eksperyment, który miał na celu „przekonanie” roślin należących do kilku gatunków, że ich czas życia mierzony liczbą dni jest różny, co osiągnięto poprzez eksperymentalne zróżnicowanie długości doby. Na podstawie uzyskanych wyników wskazuje się, że do pewnego stopnia rozwój niektórych roślin poddał się narzuconemu rytmowi, podczas gdy innym było wszystko jedno jak długo trwa doba. Badania te wykonane przed laty miały na celu wyłącznie zaspokojenie ciekawości naukowej, natomiast obecnie można by dla ich wyników znaleźć ciekawe zastosowania, np. w systemach uprawy roślin na skalę przemysłową w warunkach sztucznego oświetlenia lub dla przyszłej uprawy roślin na stacjach kosmicznych, gdzie dostępność energii słonecznej może nie podlegać dobowym rytmom.

Czas jest czynnikiem włączającym procesy rozwojowe u wielu roślin. Dzieje się tak nie tylko podczas reakcji fotoperiodycznej, ale też, zaskakująco, podczas wernalizacji. Trzeba pamiętać, że aby wernalizacja była skuteczna, musi trwać przez określony, minimalny czas. Można zatem powiedzieć, że w tym procesie temperatura pełni funkcję przekaźnika, który włącza licznik czasu (zegar, a może raczej kalendarz, ponieważ czas ten mierzy się w tygodniach) tylko, wtedy gdy temperatura spadnie poniżej pewnej granicy. W praktyce wpływ temperatury na pomiar czasu jest bardziej złożony, ponieważ wernalizacja zachodzi w pewnym przedziale temperatury, a przełącznik sterowany temperaturą włączający pomiar czasu ma pewien niezbyt wielki zakres pracy, w dodatku zależny od warunków świetlnych. U zbóż wernalizacja w ciemności jest możliwa w przedziale temperatur od ok.  $-1$  do  $5-7^{\circ}\text{C}$  z optimum około  $2^{\circ}\text{C}$ , natomiast na świetle zakres aktywnych temperatur przesuwają się o kilka stopni wwyż. Można zatem stwierdzić, że wpływ światła na tempo działania zegara jest tak samo silny, jak wpływ temperatury. W przypadku wernalizacji występuje pewien paradoks. Otóż, wzrost temperatury przyspiesza z reguły przebieg reakcji chemicznych, zwykle dwu-, trzykrotnie przy wzroście temperatury o  $10^{\circ}\text{C}$ . Wskaźnik ten nazywamy współczynnikiem temperaturowym  $Q_{10}$ . Stopień zaindukowania generatywnego rośliny uzyskany w wyniku wernalizacji powinien wynikać z postępu pewnych reakcji chemicznych. Jak na razie brak alternatywnych, niechemicznych hipotez indukcji. Tymczasem indukcja generatywna postępuje szybciej w niższej temperaturze ( $2^{\circ}\text{C}$ ) aniżeli w temperaturze wyższej (np.  $7^{\circ}\text{C}$ ). Oznacza to, że procesy biochemiczne zaangażowane w indukcję generatywną roślin ozimych powinny charakteryzować się wartością współczynnika  $Q_{10}$  mniejszą od 1. To z kolei oznaczałoby ujemną energię aktywacji tych reakcji. Nieznane są reakcje chemiczne o takiej właściwości. Inny ciekawy związek temperatury i pomiaru czasu



w procesie wernalizacji przejawia się w tym, że czas wernalizacji biegnie szybciej (wernalizacja jest efektywniejsza), gdy temperatura oscyluje wokół pewnej wartości średniej aniżeli, gdy odbywa się w stałej temperaturze. Jak dotąd nie potrafimy wytłumaczyć przyczyn tego zjawiska. Roślinny zegar lub kalendarz, aktywny podczas wernalizacji, ma jeszcze jedną ciekawą właściwość. Otóż, dostatecznie wysoka temperatura (np. 20°C) resetuje zegar, a zatem czas wernalizacji należy liczyć prawie od zera. Badano, co się stanie, kiedy zegar ten zresetować więcej niż jeden raz, nawet do dziesięciu razy. Okazuje się, że jeśli liczba wyłączeń zegara zwiększa się, a zatem okresy jego pracy skracają się do kilku dni, po których następuje dzień przerwy cieplnej, zegar się rozregulowuje i zaczyna odmierzać czas szybciej, w wyniku czego szybciej rośnie efektywność wernalizacji. Możliwe, że przy coraz częstszych przerwach zaczynamy się zbliżać do ujawnienia korzystnego wpływu oscylacji.

Inne czynniki mogą także wpływać na szybkość fizjologicznej lokalnej percepcji czasu. Przykładowo, u kapustnych zegar mierzący czas wernalizacji może być włączony tylko u starszych, kilkuliściowych roślin, podczas gdy u zbóż zegar ten włącza się w każdym wieku, nawet u niedojrzałych zarodków około dwa tygodnie po zapyleniu. Z innych czynników wpływających na bieg zegara roślinnego jest żywienie mineralne. Obfitość dostępnego azotu zwykle opóźnia kwitnienie roślin, czyli spowalnia bieg ich zegara, podczas gdy słabe żywienie lub niedostatek asymilatów powodują, że rośliny wprawdzie plonują nisko, ale za to nieco wcześniej. Ich zegar biologiczny biegnie zatem trochę szybciej.

Dla porządku należy też wspomnieć, że być może czas jest tylko pośrednim czynnikiem wernalizacji, a głównym czynnikiem jest to, jaka część komórek w merystemie wierzchołkowym będącym receptorem wernalizacji, powstała w niskiej temperaturze. Jeśli powstała minimalna „ilość progowa” zwernalizowanych komórek, wówczas jest możliwe ukierunkowanie całego merystemu w stronę generatywnego rozwoju.

Innym procesem, w którym czas steruje rozwojem roślin jest spoczynek nasion. Spoczynkowy zarodek w nasieniu ma jakby wyłączony zegar. Może bowiem pozostawać w fazie spoczynkowej przez długi czas, w przypadku nasion niektórych chwastów mierzony nawet dziesiątkami lat. Spoczynek ten może zostać przerwany błyskiem światła, które uruchamia zegar zaczynający odliczać wiek rośliny. Zegar rusza w momencie przerwania spoczynku, niezależnie od tego, z jakiej przyczyny się to stało. Na przykład, podczas stratyfikacji nasion, czyli indukcji zdolności nasion do kiełkowania w wyniku okresowego działania niską temperaturą okazuje się, że w nasionach działają dwa zegary. Pierwszy uruchamiany pod wpływem niskiej temperatury włącza się na początku stratyfikacji, odmierzając długość jej trwania. Kiedy się zatrzyma, włącza się drugi zegar, który zaczyna odmierzać czas życia rosnącej rośliny.

W pozostałych przypadkach, dotyczących spoczynku nasion, można przyjąć, że wewnętrzny zegar zarodków włącza się w momencie przerwania spoczynku i startu-



je od zerowego stanu, ponieważ dalszy rozwój siewek nie zależy od tego, czy spoczynek został przerwany wcześniej, czy później.

Zadaniem wewnętrznego zegara roślin jest synchronizacja ich procesów fizjologicznych z cyklicznie zmieniającymi się warunkami zewnętrznymi. Jednakże warunki zewnętrzne zmieniają się cyklicznie z dwojaką częstotliwością: jako cykl roczny i jako cykl okołodobowy. Dlatego też w wielu roślinach funkcjonują dwa typy zegara: odmierzający długie odcinki czasu, zsynchronizowany z rytmem rocznych zmian warunków klimatycznych (czyli rodzaj kalendarza) oraz rodzaj stopera, który po upływie doby jest zerowany i mierzy czas na nowo tak, jak nasze zegary, synchronizując swoją pracę z rytmem okołodobowym. Warto zauważyć, że u roślin wrażliwych nie tylko na dobowy fotoperiod, ale też na to, czy dzień się wydłuża czy też skraca (u roślin typu SLDP, ang. *short-long day plants* lub LSDP, ang. *long-short day plants*) nastąpiło połączenie funkcji obydwu zegarów, ponieważ zegar okołodobowy poprzez rejestrację tendencji zmian długości dnia w kolejnych dobach informuje o tym, w którym miesiącu roku aktualnie się znajduje roślina, np. czy jest to kwiecień czy też sierpień.

Rośliny są w stanie zaskakująco precyzyjnie dostosowywać się do biegu zegara okołorocznego. Wszyscy pracujący z kulturami *in vitro* wiedzą, że kultury lepiej rosną w pewnej porze roku, zwykle wiosną i latem, a najgorzej rosną zimą. Wydawałoby się, że w warunkach *in vitro* rośliny lub ich komórki rosną w kompletnej izolacji od warunków zewnętrznych. Hodowla kultur tkankowych powinna zapewnić bowiem możliwość pełnej regulacji lub stabilizacji warunków w oderwaniu od pory roku lub pory dnia, a jednak obiekty te, jak się wydaje, mają zakodowaną prawdziwą datę wyznaczoną przez zewnętrzny kalendarz.

We wcześniejszych pracach zaobserwowaliśmy też inne zadziwiające zdarzenie (3). Podczas eksperymentów, w których wykorzystywano kalus rzepaku ozimego i jarego indukowany z hipokotyli siewek, odnotowaliśmy w kolejnych eksperymentach zakładanych co pewien czas w okresie dwóch lat okresowe zmiany szybkości wzrostu kalusa. Była to w zasadzie okołoroczna rytmika z tym, że odmiana jara i ozima reagowały z kilkumiesięcznym przesunięciem. Reakcja tych odmian stała się zrozumiała dopiero, wtedy gdy odnieśliśmy ją do terminu siewu – jarej odmiany w kwietniu, a ozimej w sierpniu. Tak zatem, obydwie odmiany rosły w warunkach *in vitro* najlepiej w tym okresie, w którym byłyby wysiane w polu.

Najszerzej badane były zjawiska związane z okołodobowymi rytmemi w roślinach. Sztandarowym przykładem jest rytmiczne otwieranie się i zamykanie kwiatów niektórych gatunków roślin, następujące o określonej godzinie. Obrazuje to zegar kwiatowy Linneusza. Innym przykładem są okołodobowe oscylacje stopnia rozwarcia aparatów szparkowych, które trwają jeszcze jakiś czas po przeniesieniu roślin do pełnej ciemności. Rytm ten odpowiada ruchom aparatów szparkowych roślin znajdujących się w warunkach naturalnych. Śmiało można powiedzieć, że zapewne wszystkie procesy fizjologiczne i biochemiczne zachodzące w roślinie, a zatem nie tylko kierunek wymiany gazowej, wykazują dobowe oscylacje. W licznych badaniach



wykazano, że aktywność analizowanych enzymów zmienia się w ciągu doby, a stężenie każdego zapewne metabolitu komórkowego wykazuje mniejsze lub większe oscylacje dobowe (4,5). Oscylacje te związane są głównie z naturalnym rytmem dnia i nocy, ponieważ zmienny dopływ materiałów pokarmowych może być potężnym bodźcem do pozostałych zmian metabolicznych.

Fotoperiodyzm jest także bardzo powszechnie znanym i od lat badanym procesem zależnym od dobowego rytmu zmian światła i ciemności. Najbardziej wrażliwym fotoperiodycznie roślinom wystarczy pojedynczy, odpowiedniej długości fotoperiod, aby określić, czy pora roku jest odpowiednia do indukcji kwitnienia, przy czym długość granicznego fotoperiodu może być przez rośliny rozpoznana z dokładnością do kwadransa. Ten tak dokładny zegar biologiczny zlokalizowany jest w wyrośniętych, ale w pełni aktywnych fizjologicznie liściach. Udział roślinnego fitochromu w regulacji fotoperiodyzmu dawno przestał być tylko hipotezą. Fotoreceptor ten występuje w dwóch głównych konformacjach, rozróżnianych przez to, że jedna z nich absorbuje światło czerwone o  $\lambda = 660$  nm (stąd nazwa tej formy  $P_{660}$ ), druga absorbuje daleką czerwień o  $\lambda = 730$  nm (stąd nazwa tej formy  $P_{730}$ ). Obydwa procesy są odwracalne tzn.  $P_{660}$  absorbując światło czerwone przechodzi w formę  $P_{730}$ , a ta albo w ciemności spontanicznie, albo też pod wpływem dalekiej czerwieni przechodzi w formę  $P_{660}$ . Procesy absorpcji światła indukujące zmiany konformacyjne fitochromu są procesami biofizycznymi i jako takie są mało zależne od temperatury. Fakt ten należy podkreślić, ponieważ świadczy o specyfice tego mechanizmu, dzięki któremu zmiany konformacji fitochromów są bardzo stabilne. Warunki pogodowe są zmienne i danego dnia w roku wszystkie czynniki klimatu (np. natężenie promieniowania słonecznego, temperatura, wilgotność powietrza) mogą się zmieniać, a tylko długość dnia jest z roku na rok taka sama. Fakt ten mógł być jednak wykorzystany tylko w takim procesie fizjologicznym, który możliwie mało zależałby od temperatury. Pomiar proporcji pomiędzy liczbą cząsteczek obydwu form fitochromu może zatem informować roślinę o długości dnia.

Oczywiście świat roślin jest bogatszy niż prosta klasyfikacja dokonywana przez człowieka. Oprócz roślin dnia krótkiego – SDP (ang. *short day plants*) i długiego – LDP (ang. *long day plants*), występują także rośliny SLDP i LSDP reagujące odpowiednio na dzień wydłużający się i skracający, rośliny dnia neutralnego czyli NDP (ang. *neutral day plants*) i wreszcie rośliny (np. pomidor), u których kwitnienie indukuje nie długość dnia, ale zgromadzenie odpowiedniej ilości materiałów zapasowych. Zaburzenie równowagi pomiędzy donorami i akceptorami asymilatów także wpływa na szybkość pracy zegara roślinnego. Na przykładzie bobiku przekonano się, że usunięcie wierzchołka wzrostu pędu powstrzymuje odrzucanie strąków, które w większej liczbie eksploatują liście (6). W tych warunkach następuje szybsze zasychanie liści, strąków i całej rośliny, co oznacza, że zmniejszenie dostępności asymilatów przyspiesza bieg zegara. Dla kontrastu, usunięcie części lub wszystkich strąków opóźnia procesy starzenia liści, które dłużej pozostają zielone. Wynika z tego, że większa obfitość asymilatów spowalnia bieg zegara roślinnego.



## 6. Biologiczny pomiar czasu – przypuszczalne mechanizmy działania zegara biologicznego

Na wstępie wspomniano o najpowszechniejszym sposobie pomiaru czasu przez ludzi, opartym na zliczaniu liczby cykli pewnych oscylujących procesów. Czy taka sama zasada mogłaby stanowić podstawę działania zegara biologicznego? Wyobraźmy sobie następujący ciąg zdarzeń w komórce: występuje niedobór metabolitu X, uruchamia to transkrypcję odpowiedniego genu, transkrypt inicjuje biosyntezę nowych cząsteczek enzymu, co przyspiesza reakcję syntezy metabolitu X, następuje wzrost stężenia tego metabolitu. Po przekroczeniu pewnego krytycznego stężenia następuje zablokowanie syntezy nowych cząsteczek enzymu, dochodzi do rozpadu kompleksu rybosom–mRNA i degradacji mRNA. Proteazy komórkowe stopniowo degradują kolejne cząsteczki enzymu, wywołując tym samym spowolnienie syntezy metabolitu X – następuje jego niedobór i tym sposobem cykl zdarzeń się zamyka.

Oscylację stężenia metabolitu X opisuje 10 wymienionych etapów. Liczba takich oscylacji mogłaby napędzać zegar biologiczny. Problem tylko w tym, że jest to ogólny mechanizm samoregulacyjny, według którego mogłaby następować oscylacja stężeń wielu metabolitów, niekoniecznie związanych z pomiarem czasu. Ewentualnego „kandydata” należałoby szukać wśród procesów o wartości współczynnika temperaturowego bliskiej 1, ponieważ hipotetyczny zegar biologiczny powinien być mało zależny od temperatury.

Inną możliwością pomiaru czasu mogłaby być ilość przetworzonego substratu. Taki zegar przypominałby bardziej klepsydrę niż oscylator i wykazywałby tę samą niedoskonałość co poprzedni, tzn. szybkość upływu czasu byłaby zależna od temperatury.

Zegar odmierza czas nie tylko całego organizmu, ale także poszczególnych komórek. Niezależnie od tego, jak liczyć wiek komórki i niezależnie od ewentualnych nagłych zdarzeń powodujących śmierć komórki, także i w nich funkcjonuje zegar odmierzający czas i regulujący sukcesję faz cyklu komórkowego lub procesy różnicowania komórkowego. Zegar ten resetuje się podczas mitozy. Niektóre procesy takie, jak nagromadzenie nieusuniętych mutacji lub zbyt daleko zaawansowane procesy cytodyferencji uniemożliwiają zrestartowanie zegara biologicznego. Komórka taka będzie starzała się bez możliwości mitotycznego odmłodzenia. Z komórek niezdolnych do mitozy zbudowane są w roślinach tzw. tkanki niemerystatyczne czyli stałe.

O ile zahamowanie zdolności do mitoz, jak się wydaje, jest związane ze starzeniem się komórki, o tyle proces przeciwny, czyli niekontrolowana zdolność do podziałów komórek, może oznaczać, że zachowują one ciągłą młodość. Wynikiem tego jest nadmierny rozrost grupy komórek, nazywany nowotworem. Nie jest to jednak specjalność organizmów zwierzęcych, ponieważ bodaj – czy nie jeszcze częściej – zjawisko przywracania zdolności do podziału komórek w tkankach stałych występuje u roślin.



Można wymienić takie procesy naturalne, jak zabliznianie ran, atak niektórych owadów powodujących lokalny gwałtowny rozrost tkanek roślinnych w postaci galasów czy struktur szyszkopodobnych na młodych pędach świerka, atak bakterii z rodzaju *Rhizobium*, wynikiem czego są tumory (po ataku *Agrobacterium tumefaciens*) lub splątana struktura włośnikopodobna (po ataku *Agrobacterium rhizogenes*). Również generalnie pozytywny proces symbiozy roślin motylkowatych z bakteriami *Rhizobium* lub *Bradyrhizobium* przebiega poprzez niespodziewany reset zegara w komórkach korzenia, wznowienie ich podziałów i wytworzenie brodawek symbiotycznych.

W trakcie starzenia się komórki zachodzi w niej sporo niekorzystnych procesów takich, jak nagromadzenie się mutacji w DNA oraz przede wszystkim akumulacja RFT – reaktywnych form tlenu (nadtlenu wodoru, rodnika ponadtlenkowego i hydroksylowego), której naturalne systemy antyoksydacyjne nie są zdolne powstrzymać. RFT przyczyniają się do dalszych procesów degradacyjnych w komórce, w tym zmian konformacyjnych białek, zmian struktury i utraty funkcji plazmolemy, peroksydacji lipidów błonowych, czy wreszcie kumulacji różnych związków fenolowych, które przyczyniają się do dalszej degradacji składników komórki, głównie białek. W ten sposób dochodzimy do określenia nowego czynnika stresowego jakim jest stres starzenia. Oznacza to, że czas może być postrzegany jako czynnik indukujący stres, czyli jak stresor, pamiętając jednak, że najczęściej to właśnie różne stresy biotyczne i abiotyczne przyspieszają procesy starzenia w roślinach, czyli przyspieszają bieg roślinnego zegara.

Hormony roślinne mogą wpływać na szybkość procesów starzenia komórek, a zatem tak, jakby wpływać na szybkość odmierzenia czasu przez zegar komórkowy, przyspieszać go, spowalniać, a nawet cofać! Wygląda na to, że roślinne hormony mogą zrobić to, czego ludzie być może nigdy nie opanują – cofać lokalny czas komórki. Rozumując w ten sposób możemy powiedzieć, że:

- cytokiny cofają, a nawet zerują zegar komórkowy, indukując lub przywracając zdolność komórek do podziału i zmniejszając natężenie stresu oksydacyjnego,
- auksyny głównie zwiększają elastyczność ściany komórkowej dojrzałych komórek, upodabniając ją do ściany pierwotnej, jak u młodych komórek, w kulturach *in vitro* indukują zdolność komórek do podziału; można zatem powiedzieć, że auksyny głównie spowalniają zegar komórkowy, a jedynie w kulturach tkankowych, działając w stężeniach o kilka rzędów większych niż w roślinach mogą wyzerować zegar komórkowy,
- kwas abscysynowy i czasami także etylen przyspieszają procesy starzenia komórek, a zatem tak, jakby przyspieszały bieg zegara komórkowego.

## 7. Czas w kulturach *in vitro*

Czas w kulturach *in vitro*, jak się wydaje, podlega innym regulacjom. Generalnie indukcja kalusa oznacza odmłodzenie komórek poprzez przywrócenie im zdolności



do mitozy. Odbywa się to dzięki zwiększeniu dostępności substancji mineralnych i pokarmowych, a także zwiększenie o kilka rzędów stężenia auksyn i cytokinin i uwolnienie tkanek roślinnych od patogenów i zakażeń. Aby utrzymać komórki w stanie odmłodzenia należy co pewien czas odnawiać pożywkę, czyli pasażować kultury. W ten sposób niektóre kultury tkankowe mogą pozostawać w stanie niemal niezmiennym przez bardzo długi okres, jak to jest ze znaną i utrzymywaną przez wiele lat kulturą kalusa marchwi. Natomiast w innych kulturach kalusowych po okresowym zatrzymaniu lub nawet cofnięciu zegara, zaczyna on ponownie przyspieszać. Kultury się starzeją w tym sensie, że nagromadza się w nich coraz więcej starych komórek, spada tempo wzrostu, akumulują się fenole i w końcu kalus zamiera. Proces ten można jeszcze przez jakiś czas powstrzymać poprzez pasażowanie najszybciej rosnących jasnych fragmentów kalusa, jako źródła nowych komórek.

Innym przykładem kultury, w której czas się zatrzymał, jest ustabilizowana płynna kultura zawieszinowa. Odnawianie tej kultury następuje zazwyczaj poprzez okresowe rozdzielanie zawartości kolby hodowlanej do nowych kolb i uzupełnienie pożywką do początkowej objętości. W kulturze tej następuje ciągłe namnażanie aktywnych młodych komórek, podczas gdy w wyniku pasażowania do nowej pożywki stężenie komórek starzejących się ulega zmniejszeniu i stąd cała kultura może osiągnąć stabilnie młody stan, jak gdyby ich zegary komórkowe się zatrzymały.

Zgodnie z wcześniejszymi rozważaniami, różnicowanie komórki jest oznaką początków starzenia, jako że potem nastąpi blokada jej zdolności do mitozy. W tym znaczeniu czas kalusa niezdolnego do różnicowania, którego komórki dzielą się i pozostają niezróżnicowane, zatrzymuje się albo przynajmniej znacznie zwalnia. W przeciwieństwie do tego rodzaju kalusa, w łatwo różnicującym kalusie następuje włączenie zegara komórkowego. Regeneracja bowiem nieuchronnie prowadzi do wytworzenia centrów różnicowania wymagających specjalizacji komórek, a to jest symbolem początku starzenia. Nie zmienia to faktu, że czasami różnicowanie dotyczy tylko pewnych pojedynczych komórek, podczas gdy pozostała masa komórek kalusa pozostaje młodociana. Kalus ten wówczas będzie przez pewien, czasami nawet długi, czas pozostawał zdolny do embriogenezy. W każdym takim kalusie jednakże stopniowo przybywa komórek z włączonym zegarem, chyba, że będziemy systematycznie izolować powstające embriony dając młodszym komórkom większe szanse do dominacji w kulturze.

Kultury *in vitro* są jedną z głównych technik umożliwiających uzyskanie roślin haploidalnych na drodze androgenezy. Zmuszenie ziaren pyłku do zmiany roli generatywnej na somatyczną nie zawsze jest sprawą łatwą (7,8). Aby wywołać ten efekt poddaje się niedojrzałe kwiatostany wpływowi różnych czynników stresowych. Do najczęściej stosowanych należy stres solny, czy wpływ niskiej temperatury. Stres jednak nie może działać w zbyt dużym natężeniu, wywołałby bowiem nieuchronną degenerację ziaren pyłku. Dlatego też wkracza tu drugi czynnik – oczywiście czas. Według Lichtenthalera (9) „stres to taka sytuacja, w której limit tolerancji został przekroczony i zdolność do adaptacji wyczerpana, wynikiem czego dochodzi do



trwałych uszkodzeń lub nawet śmierci”. Ten sam autor (10) uważa też, że łagodny stres może aktywować metabolizm komórki, indukować wzrost aktywności fizjologicznej roślin i nie powoduje żadnych uszkodzeń nawet podczas długiego czasu działania. Łagodny stres może nawet być korzystny dla roślin. Efekt działania stresora zależy od kondycji (fizjologicznego stanu) rośliny, natężenia czynnika stresowego oraz czasu jego oddziaływania. Reasumując, chcąc wywołać reakcję rośliny, bez ryzyka jej śmierci musimy dobrać odpowiednie natężenie czynnika stresującego oraz czas jego działania.

Na zakończenie parę słów o protoplastach. Zwykle myśląc o specyfice protoplastów podkreślamy fakt, że są to komórki pozbawione ściany komórkowej. Mniej natomiast uwagi przywiązuje się do tego, że są to komórki, w których doszło do zerwania plazmodesm, łączących je w tkance z innymi komórkami. Może fakt zerwania kontaktu z innymi komórkami jest bogatszy w konsekwencje, biorąc pod uwagę to, że regeneracja strawionej ściany komórkowej następuje niewiele godzin po izolacji. Zerwanie kanałów informacyjnych łączących protoplast z innymi komórkami może oznaczać dla niego kompletną „dezorientację”. Niektórzy naukowcy wyrażają dość kontrowersyjną, choć ciekawą opinię, że roślina (przenieśmy to na komórkę) pozbawiona sygnałów docierających ze środowiska traci orientację w kwestii optymalnych reakcji i procesów, jakie mają w niej zachodzić. W kulturach protoplastów przywrócona zostaje zdolność do podziałów mitotycznych, czyli ich zegar wewnętrzny zostaje zresetowany tak, jak w innych komórkach w hodowli *in vitro*. Zerwanie więzi międzykomórkowych indukuje jednak nową jakość. Czy nie jest tak, że protoplasty pod względem rozwojowym zbliżają się nie tylko do komórek merystematycznych, ale nawet do komórek gametycznych lub zygoty? Komórki te, jako zaczątek nowego organizmu, mogą właśnie potrzebować uwolnienia się od kontaktów, czasami nawet krępujących ich swobodę, z innymi komórkami. Być może dlatego protoplasty wykazują zdolność do somatycznej fuzji z innymi komórkami (pod względem fizycznym podobnej do fuzji gametycznej), a także do fuzji ich genomów. Następowaloby wówczas nie tylko resetowanie zegara komórkowego, ale także wyzerowanie licznika cykli mitotycznych, a zatem pojawienie się swoistej „pętli czasowej”. Opisane zjawiska wiążą się z tak dużym stresem, że tylko niektóre protoplasty są zdolne go przeżyć i rozpocząć od nowa procesy rozwojowe.

## 8. Podsumowanie

Zamiarem autorów było przedstawienie rozważań nad różnymi aspektami postrzegania czasu w tak złożonych obiektach, jak wielokomórkowe organizmy oraz w ich uproszczonych modelach, jakimi są kultury *in vitro*. Zdawać by się mogło, że dla każdego organizmu upływ czasu oznacza tylko jedno – nieuchronne zbliżanie się do końca życia. Tymczasem, do jego funkcjonowania, dojrzewania, osiągnięcia wszystkich faz rozwojowych potrzeba właśnie czasu. Zatrzymanie czasu w miejscu



nie przyniosłoby zatem korzyści ani roślinom, ani organizmom zwierzęcym, czy ludziom. Mamy nadzieję, że udało nam się spowodować by Czytelnicy sami zatrzymali się w zadziwieniu nad złożonością tej jednej z czterech zmiennych otaczającej nas czasoprzestrzeni.

## Literatura

1. Dixon R. A., Paiva N. L., (1995), *Plant Cell*, 7, 1085-1097.
2. Hammond-Kosack K. E., Jones J., (1996), *Plant Cell*, 8, 1773-1791.
3. Żur I., Dubert F., (1997), *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej im. H. Kołłątaja*, 50, 585-588.
4. Dubert F., Skoczowski A., Skrzypek E., (2000), *IV International Conference „Ecophysiology of plant production processes in stress conditions”*, Račkova Dolina, Materiały Konferencyjne, 118.
5. Dubert F., Filek M., Marcińska I., Skoczowski A., (1992), *J. Agron. & Crop Sci.*, 4168, 113-141.
6. Czyczyło I., (1999), *Acta Physiol. Plant.*, 21, (suppl. 3), 39.
7. Touraev A., Vicente O., Heberle-Bors E., (1997), *Trends in Plant Sci.*, 2, 297-302.
8. Smýkal P., (2000), *Biol. Plant.*, 4, 481-489.
9. Lichtenthaler H. K., (1996), *J. Plant Physiol.*, 148, 4-14.
10. Lichtenthaler H. K., (1988), *In vivo chlorophyll fluorescence as a tool for stress detection in plants*, in: *Applications of chlorophyll fluorescence*, Ed. H. K. Lichtenthaler, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 129-142.