

STRESZCZENIE

Od początku rozwoju kwiatu pierwotne ściany komórkowe, znajdujące się na powierzchni epidermy działek kielicha (zewnętrzne ściany peryklinalne komórek epidermalnych) stanowią najbardziej zewnętrzną barierę chroniącą działki i kwiat przed stresem środowiskowym, patogenami, uszkodzeniami mechanicznymi i uczestniczą w wymianie gazowej. Dynamiczna przebudowa pierwotnych ścian komórkowych jest konieczna do ich ekspansji, umożliwiając wzrost komórek oraz koordynację między komórkami niezbędną do wykształcenia funkcjonalnego organu. Choć skład ściany komórkowej był szeroko badany, kompleksowe podejście pozwalające na jednoczesną analizę wszystkich jej głównych składników oraz śledzenie ich zmian podczas rozwoju organu jest ograniczone. W niniejszej pracy pierwotne ściany komórkowe epidermy działki kielicha *Arabidopsis thaliana* wykorzystano do analizy ich składu. Ponadto badano powstawanie wzoru kutykularnego w typie dzikim oraz u mutantów ściany komórkowej podczas dojrzewania działki kielicha. W badaniach wykorzystano mikrospektroskopię Ramana, która umożliwia ocenę ogólnego składu ściany komórkowej podczas pojedynczego pomiaru. Natomiast mikroskopię konfokalną wykorzystano do przeprowadzenia obserwacji *in vivo* powierzchni komórek epidermy w trakcie dojrzewania działki kielicha. Dzięki temu uzyskano dodatkowe informacje o dynamice ściany komórkowej, ze szczególnym uwzględnieniem powstawania wzoru kutykularnego. Cele badań obejmowały weryfikację następujących hipotez: (i) Skład pierwotnej ściany komórkowej epidermy działki kielicha *Arabidopsis* zmienia się podczas rozwoju działki a mutacje *csi1*, *mad5*, *pme32*, *xyll* wpływają na zmiany w składzie; (ii) Pierwotna ściana komórkowa epidermy działki kielicha *Arabidopsis* wykazuje anizotropię strukturalną wynikającą z uporządkowania jej składników; (iii) Niedobór jednego składnika ściany komórkowej u mutantów *Arabidopsis* aktywuje mechanizm kompensacyjny; (iv) Początkowy wzór prążków kutykularnych pojawiających się na zewnętrznych ścianach peryklinalnych działki kielicha jest zależny od wzrostu i geometrii komórki w momencie powstawania wzoru; (v) Wzór prążków kutykularnych zmienia się w trakcie wzrostu komórek. Pomiary z wykorzystaniem mikrospektroskopii Ramana wykazały zmiany ontogenetyczne w składzie pierwotnej ściany komórkowej podczas dojrzewania epidermy działki kielicha *Arabidopsis*, przejawiające się różnicami intensywności sygnału i różnicami w udziale dwóch widm składowych zidentyfikowanych przy użyciu metody rozdzielania krzywych wielowymiarowych. Zmiany te wskazują, że skład ściany komórkowej ulega przebudowie podczas dojrzewania organu. Analiza map Ramanowskich powierzchni ścian działki kielicha

pozwoili wyróźnić dwa regiony z przypisanymi specyficznymi widmami: ścianę komórkową znajdującą się pomiędzy prążkami kutykularnymi oraz ścianę pokrytą prążkami. Widma tych regionów wykazywały niewielkie różnice w składzie, w tym dodatkowe pasma w ścianach pokrytych prążkami. Ponadto ujawniono różnice jakościowe między badanymi mutantami a typem dzikim. W widmach Ramana zidentyfikowano pasma wrażliwe na polaryzację, które wskazują na anizotropię strukturalną ściany. Pasma zależne od polaryzacji były związane nie tylko z celulozą, ale również ze składnikami kutykuli. Celuloza była uporządkowana w pierwotnych ścianach komórkowych w podobnym stopniu zarówno u typu dzikiego, jak i u badanych mutantów, z wyjątkiem *mad5*. Fenotyp *mad5* jest podobny do innych mutantów kataniny, u których zmieniona jest dynamika mikrotubul. Anizotropia strukturalna składników kutykuli działki kielicha *Arabidopsis*, która była podobna w typie dzikim i badanych mutantach, nie była dotychczas opisywana. Sugeruje to, że nawet cienka kutykula epidermy kielicha *Arabidopsis* wykazuje pewien stopień uporządkowania. Dalsze badania o wyższej rozdzielczości są potrzebne, aby wyjaśnić tę cechę struktury kutikuli. Porównanie udziału sygnałów Ramana związanych z pektynami, celulozą i hemicelulozą w widmach ścian typu dzikiego i mutantów pozwoliło pośrednio ocenić względny udział trzech głównych polisacharydów w ścianie. U mutantów spadek sygnału przypisanego jednemu składnikowi był równoważony przez wzrost sygnałów innych składników. Jest to prawdopodobnie przejaw mechanizmu kompensacyjnego utrzymującego strukturę i właściwości mechaniczne ściany komórkowej pomimo zmian w składzie. Obserwacje z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej *in vivo*, połączone z ilościową analizą wzrostu powierzchni i krzywizny działki kielicha, wykazały, że prążki kutykularne dekorujące powierzchnię abaksjalną działki kielicha *Arabidopsis* powstają na początkowo gładkich ścianach peryklinalnych, gdy powierzchnia ścian nadal się powiększa. Wzór prążków kutykularnych zależy od anizotropii wzrostu i krzywizny powierzchni oraz jej geometrii. Zgodnie z modelami wyjaśniającymi formowanie prążków jako wyboczenie mechaniczne, orientacja nowo powstałych prążków była najczęściej równoległa do kierunku maksymalnego wzrostu zarówno na poziomie komórkowym, jak i subkomórkowym. Związek między orientacją prążków a kierunkami krzywizny powierzchni ściany był znacznie słabszy. Jednak unikalna złożoność wzoru prążków na powierzchni działki kielicha *mad5* wydaje się być związana z dużą krzywizną komórek epidermalnych tego mutantu. Stopień uporządkowania i morfologia prążków kutykularnych zmieniają się podczas ekspansji powierzchni działki kielicha. Anizotropia wzoru prążków wzrastała lub malała w czasie wzrostu powierzchni komórek. Spadek anizotropii często wiązał się z powstawaniem nowych krótkich prążków, czasami prostopadłych do wcześniej utworzonych, natomiast

wzrost anizotropii był związany z prostowaniem prążków już istniejących. Zmiany anizotropii wzoru kutykularnego podczas ekspansji ściany są prawdopodobnie przejawem zróżnicowania sztywności kutikuli: stosunkowo sztywny film utworzony przez właściwą kutykulę pokrywa stosunkowo miękką warstwę kutykularną, co jest zgodne z założeniami modeli powstawania prążków opartych na wyboczeniu.