KOSMOS
PROBLEMY NAUK BIOLOGICZNYCH

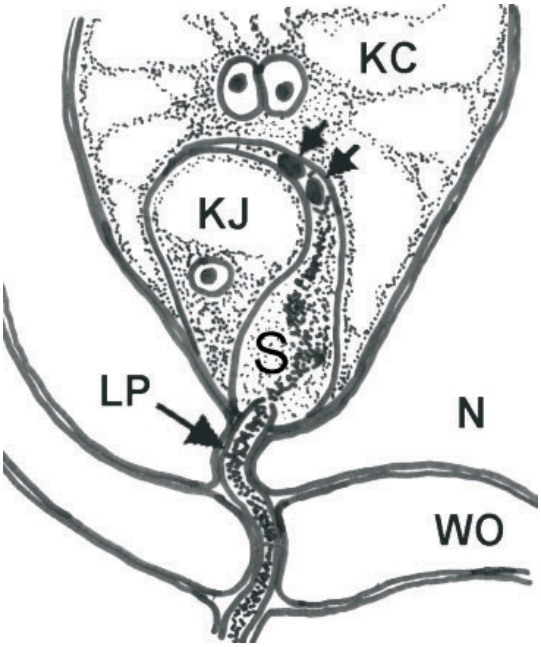
Tom 52, 2003
Numer 4 (261)
Strony 459–467
Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

RAFAŁ MÓL
Zakład Botaniki Ogólnej, Instytut Biologii Eksperymentalnej
Wydział Biologi
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
al. Niepodległości 14, 61-713 Poznań,
e-mail: ramol@amu.edu.pl

ZAPŁODNIENIE *IN VITRO* U ROŚLIN KWIATOWYCH

PODWÓJNE ZAPŁODNIENIE

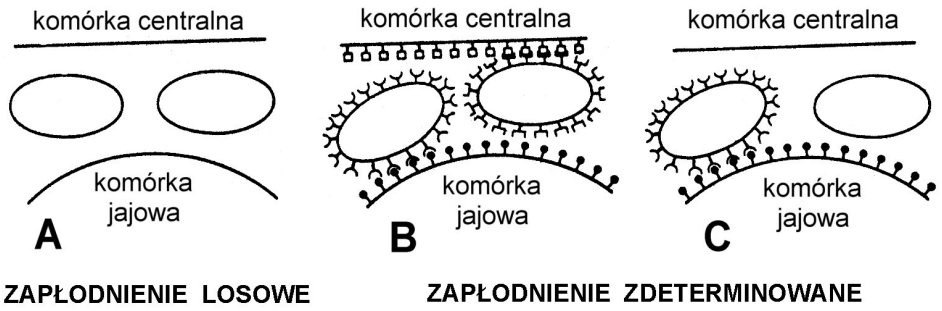
Zapłodnienie u roślin kwiatowych (Angiospermae) odbywa się wewnątrz tkanek słupka, który przyjmuje pyłek na znamieniu, stanowi dogodne środowisko dla wzrostu łagiewek pyłkowych (tkanka transmisyjna w szyjce słupka i łożysko w zalążni) oraz jest miejscem formowania się woreczków zalążkowych (w zalążkach), w których dochodzi do połączenia się gamet (syngamii). Dwa plemniki transportowane są wewnątrz łagiewki pyłkowej i uwalniane z niej do jednej z dwóch synergid, które wraz z komórką jajową tworzą aparat jajowy sąsiadujący z komórką centralną w woreczku zalążkowym (Ryc. 1). Synergidy aktywnie uczestniczą we wnikaniu łagiewki pyłkowej do woreczka zalążkowego wydzielając substancje działające na nią chemotropowo, a także stwarzając warunki umożliwiające pękanie wierzchołka łagiewki i uwolnienie gamet męskich. Dokładne omówienie tych zagadnień wykracza poza temat niniejszego artykułu, a zainteresowani czytelnicy powinni skorzystać z innych opracowań (HUANG i RUSSELL 1992, HIGASHIYAMA 2002, HIGASHIYAMA i współaut. 2003). Obie komórki żeńskie, jajowa i centralna, podlegające zapłodnieniu nie mają kompletnej ściany komórkowej, a komórki plemnikowe są jej całkowicie pozbawione — są naturalnymi protoplastami. W miejscu syngamii stykają się więc ze sobą błony komórkowe dwóch par gamet i zachodzi podwójne zapłodnienie — jedna komórka plemnikowa łączy się z komórką jajową, druga z komórką centralną, czego rezultatem jest powstanie zygoty i bielma. Prawidłowe uformowanie się zarodka z zygoty jest efektem współzależności rozwojowych między zarodkiem i bielmem podczas tworzenia się nasion.



Ryc. 1. Mikropylarny region woreczka zalążkowego podczas podwójnego zapłodnienia.

Komórki plemnikowe (małe strzałki) leżą między komórkami jajową (KJ) i centralną (KC) po uwolnieniu z łagiewki pyłkowej (LP) i synergidy (S). N — nucellus (ośrodek zalążka), WO — wewnętrzna osłonka zalążka.

Podwójne zapłodnienie odkryli S. G. Nawaszin i L. Guignard pod koniec XIX w., ale mimo późniejszych intensywnych badań przy pomocy mikroskopu świetlnego i elektronowego (RUSSELL 1992, HU 1998, JENSEN 1998) ciągle aktualne pozostaje pytanie, czy zapłodnienie u roślin jest losowe, czy zdeterminowane? Rycina 2 przedstawia trzy możliwe modele syngamii u roślin okrytonasiennych. Dotychczas opisano dwa przypadki tzw. preferencyjnego zapłodnienia. W liniach kukurydzy z jednym dodatkowym chromosomem B^A, na skutek nondysjunkcji, tylko jedna z komórek plemnikowych przenosi oba siostrzane chromosomy B^A i gameta ta częściej zapładnia komórkę jajową niż komórkę centralną (ROMAN 1948). Jednak gdy chromosomów B^A jest więcej, przechodzą one do komórek plemnikowych niezależnie od siebie i każda z nich może zapłodnić dowolną gametę żeńską. Zapłodnienie preferencyjne nie wynika więc z migracji chromosomów B^A do określonego bieguna podczas podziału komórki generatywnej, jakkolwiek jest uwarunkowane genami tych chromosomów (CARLSON i ROSEMAN 1992). U ołownicy, *Plumbago zeylanica,* występuje wyraźny dymorfizm komórek plemnikowych; jedna zawiera liczne plastydy, a druga liczne mitochondria (RUSSELL 1984). Badania ultrastrukturowe pokazały, że plastydy ojcowskie występowały przy jądrze plemnikowym częściej w komórce jajowej niż w komórce centralnej, co przyjęto za dowód preferencyjnego zapłodnienia komórki jajowej przez plemnik zawierający liczne plastydy (RUSSELL 1985). Jednak możliwa jest też inna interpretacja tych wyników (MÓL 1995). Ciągle brak dowodów wskazujących jednoznacznie, że podwójne zapłodnienie u Angiospermae jest zdeterminowane, a podane wyżej przykłady zapłodnienia preferencyjnego mogą stanowić wyjątki od reguły (?) zapłodnienia losowego. Poznanie mechanizmu zapłodnienia u roślin kwiatowych utrudnia złożoność budowy ich organów generatywnych i zaangażowanie w ten proces różnych komórek woreczka zalążkowego. Procesy warunkujące połączenie się gamet nie są dokładnie poznane. Uważa się, że w fuzji gamet Angiospermae możliwy jest udział białek powierzchniowych i/lub jonów wapnia (RUSSELL 1992). W komórkach plemnikowych stwierdzono zmiany fosforylacji białek (za pośrednictwem Ca^{2+} i kalmoduliny), a w zapłodnionych komórkach żeńskich — modyfikacje cytoszkieletu i powierzchni świadczące o ich aktywacji (PRZYWARA i POPIELARSKA 1999). Te pojawiające się nowe dane dotyczące możliwych mechanizmów fuzji gamet nie pochodzą jednak z obserwacji *in situ*, lecz z doświadczeń nad izolowanymi gametami (por. dalej). Odrębnym zagadnieniem, które nie będzie poruszane w tym artykule, jest interakcja pyłku z komórkami znamienia i oddziaływanie tkanek słupka na rosnące łagiewki pyłkowe. Dla zgłębienia tajemnic podwójnego zapłodnienia nie wystarczy dzisiaj tylko mikroskop, nawet elektronowy. Rozpoczęte w latach 80. XX w. prace nad izolowaniem gamet u okrytonasiennych stwarzają całkiem nowe możliwości badania syngamii u roślin w warunkach *in vitro*.



Ryc. 2. Modele rozpoznawania gamet podczas podwójnego zapłodnienia.

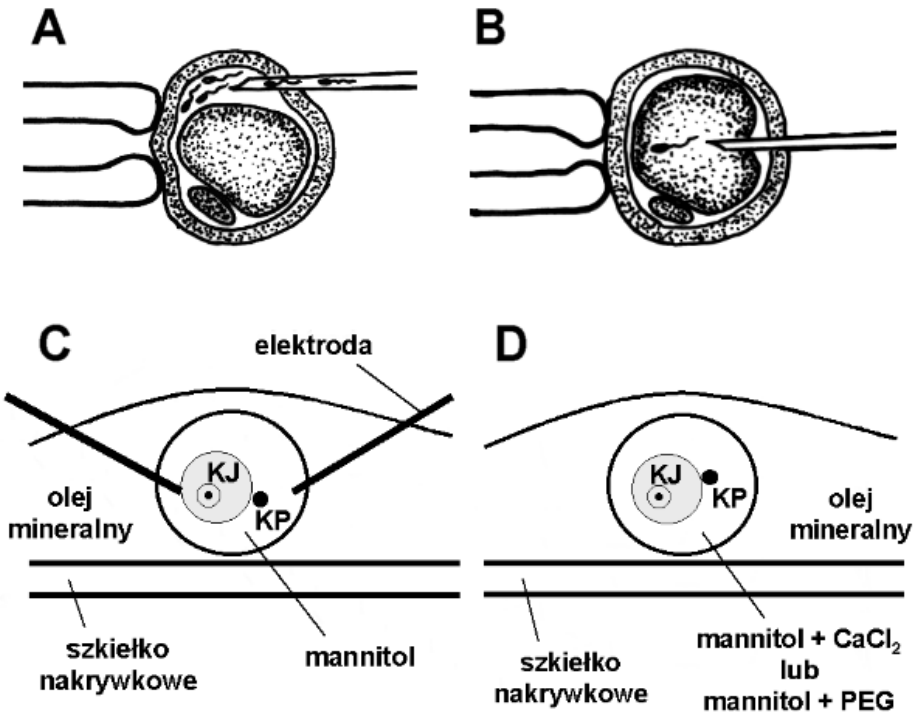
Dwie komórki plemnikowe leżą między komórkami żeńskimi: jajową i centralną (pokazane tylko fragmenty ich powierzchni; wg KNOXA i SINGHA 1987, zmieniona). A. Brak determinant na powierzchniach komórek i losowe połączenie gamet. B. Determinanty specyficzne dla komórki jajowej lub centralnej znajdują się na powierzchniach różnych komórek plemnikowych i każda para gamet łączy się specyficznie. C. Specyficzne determinanty są obecne na powierzchni tylko jednej komórki plemnikowej, która rozpoznaje i zapładnia komórkę jajową; drugi plemnik zlewa się z komórką centralną.

SYSTEMY ZAPŁODNIENIA *IN VITRO* U ROŚLIN

Dysponowanie skutecznymi metodami izolacji gamet, które zachowają żywotność podczas dalszych manipulacji było wstępnym warunkiem do podjęcia prac nad zapłodnieniem *in vitro* u roślin kwiatowych. Komórki plemnikowe izoluje się z ziaren pyłku lub łagiewek pyłkowych po poddaniu ich szokowi osmotycznemu lub mechanicznej maceracji. Komórki jajowe lub centralne izolowane są przy pomocy mikroigieł szklanych z zalążków poddanych częściowej maceracji enzymatycznej. Gamety do zapłodnienia wyławiane są z otrzymanych w ten sposób zawiesin przy pomocy szklanych mikrokapilar i są przenoszone do jednej kropli pożywki. Przeglądu odpowiednich metod dokonali THEUNIS i współaut. (1991), ROUGIER i współaut. (1996) oraz POPIELARSKA i PRZYWARA (1999).

W zapłodnieniu *in vitro* u zwierząt i człowieka powszechnie stosowana jest mikroiniekcja plemników (podosłonkowa lub do cytoplazmy; Ryc. 3). Klonowania zwierząt dokonuje się również m.in. na drodze mikroiniekcji jądra izolowanego z komórki-dawcy do komórki jajowej pozbawionej własnego jądra. Nieliczne doświadczenia nad mikroiniekcją komórek lub jąder plemnikowych do woreczków zalążkowych pokazały, że ten sposób zapłodnienia *in vitro* u roślin nie jest skuteczny — jądro plemnikowe było obecne w komórce jajowej, ale nie dochodziło do kariogamii (KEJIZER i współaut. 1988, MATTHYS-ROCHON i współaut. 1994).

Modelowym gatunkiem w badaniach nad zapłodnieniem *in vitro* jest kukurydza (*Zea mays* L.). Jej pyłek jest trójkomórkowy, tzn. zawiera komórki plemnikowe już w momencie pylenia, dlatego stosunkowo łatwo można je wyizolować w roztworze hipotonicznym. Woreczek zalążkowy *Z. mays* jest duży i po inkubacji fragmentu zalążka w roztworze enzymatycznym, zawierającym celulazy i pektynazy degradujące ścianę komórkową, można wypreparować pod mikroskopem protoplasty komórki jajowej, synergidy i komórki centralnej (KRANZ 1992). Zapłodnienie *in vitro* u kukurydzy prze-



Ryc. 3. Techniki zapłodnienia *in vitro* u ssaków (A, B) i roślin kwiatowych (C, D).

A. Z kilku plemników wstrzykniętych mikrokapilarą pod osłonkę przejrzystą jeden zapładnia oocyt. B. Mikroiniekcja jednego plemnika do cytoplazmy oocytu. C. Elektrofuzja protoplastu komórki jajowej (KJ) z komórką plemnikową (KP). D. Fuzja izolowanych gamet w obecności jonów wapnia (5 mM Ca^{2+} przy pH 6—6,5 albo 50 mM Ca^{2+} przy pH 11) lub glikolu polietylenowego (17,5 % PEG 4000).

prowadzono łącząc izolowaną komórkę plemnikową z protoplastem komórki jajowej przy użyciu impulsu elektrycznego (elektrofuzja, KRANZ i współaut. 1991a), w obecności jonów wapnia w stężeniu fizjologicznym (FAURE i współaut. 1994a) lub przy wysokim stężeniu Ca^{2+} i wysokim pH (KRANZ i LÖRZ 1994). Ponadto u tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) dokonano połączenia gamet *in vitro* stosując glikol polietylenowy PEG (TIAN i RUSSELL 1997, SUN i współaut. 2000). Poniżej omówiono poszczególne metody zapłodnienia izolowanych gamet roślin okrytonasiennych (por. Ryc. 3).

ELEKTROFUZJA

Pary izolowanych gamet umieszczone w mikrokroplach 0,55 M mannitolu i poddane działaniu pola elektrycznego (1 MHz, 71 V x cm^{-2}) ulegają dielektroforezie i przylegają kilka sekund do siebie i do jednej z elektrod. Fuzja indukowana jest 1–3 negatywnymi impulsami (50 μs, 0,9–1 kV x cm^{-1}) i zachodzi w czasie <1 s. Są to warunki stosowane również podczas elektrofuzji protoplastów izolowanych z komórek somatycznych (np. z miękiszu liścia), a więc przeprowadzona w ten sposób fuzja nie jest specyficzna dla izolowanych gamet. Jest to jednak metoda szybka i wydajna, zapewnia łatwy kontakt protoplastów plemnika i komórki jajowej przed ich połączeniem. Uzyskano tą drogą dzielące się zygoty kukurydzy (KRANZ i współaut. 1991a) i pszenicy (KOVÁCS i współaut. 1994). Zregenerowano też normalne, płodne rośliny kukurydzy (KRANZ i LÖRZ 1993). Elektrofuzja gamet nie jest specyficzna gatunkowo — można łączyć gamety różnych gatunków (KRANZ i współaut. 1995); np. komórki jajowe kukurydzy zapładniano *in vitro* plemnikami sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], łzawicy (*Coix lacrima-jobi* L.), pszenicy (*Triticum aestivum* L.), jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.) i rzepaku (*Brassica napus* L.). Metodą elektrofuzji zapładniano też komórkę centralną kukurydzy (KRANZ i współaut. 1991b, 1998).

FUZJA W OBECNOŚCI JONÓW WAPNIA

Przy tym sposobie zapłodnienia *in vitro* najtrudniejszym etapem jest manualne doprowadzenie do kontaktu izolowanego plemnika z protoplastem komórki jajowej. Należy to zrobić pod mikroskopem przy pomocy mikroigieł szklanych w mikrokropli 0,5 M mannitolu z $CaCl_2$ o objętości 2–4 μl. Adhezja i fuzja gamet kukurydzy przebiegała nieco inaczej, gdy czynnikiem stymulującym syngamię był 5 mM Ca^{2+} oraz gdy stosowano 50 mM Ca^{2+} i pH 11 (por. Tabela 1). Tę drugą metodę stosowano też w latach 70. XX w. do fuzji somatycznych protoplastów izolowanych z liści tytoniu, nie można więc uznać tych parametrów za specyficzne dla fuzji gamet.

FUZJA POD WPŁYWEM PEG

Glikol polietylenowy (PEG) jest powszechnie stosowany przy fuzji protoplastów somatycznych u różnych roślin, zastosowano go więc też do fuzji gamet tytoniu, chociaż nie pokazano, że użyte parametry (17,5 % PEG 4000 w 0,5 M mannitolu) są specyficzne dla izolowanych gamet (TIAN i RUSSELL 1997, SUN i współaut. 2000). Po manualnym doprowadzeniu do kontaktu komórki plemnikowej z protoplastem komórki jajowej przylegają one do siebie przez kilka minut, a następnie szybko się łączą (<1 s). Podobnie przebiegało zapłodnienie protoplastu izolowanej komórki centralnej. Porównanie przebiegu zapłodnienia *in vitro* przy użyciu różnych metod zestawiono w Tabeli 1.

FAURE i współaut. (1994a) przeprowadzili syngamię *in vitro* u kukurydzy stosując niskie steżenia Ca^{2+} (1–10 mM), leżące w zakresie stężeń fizjologicznych, i wykazali wysoką (80%) specyficzność fuzji dla izolowanych komórek plemnikowych i protoplastów komórek jajowych. Pozostałe z omówionych tu metod zapłodnienia *in vitro* zachodzą w warunkach umożliwiających połączenie nie tylko izolowanych gamet roślinnych, ale również protoplastów komórek somatycznych. Uniemożliwia to wnioskowanie o przebiegu plazmogamii *in vivo* na podstawie fuzji gamet *in vitro* indukowanej impulsem elektrycznym, PEG lub wysokim stężeniem Ca^{2+} i wysokim pH. Dalsze wyniki doświadczeń dotyczące procesów komórkowych, które zachodzą już po adhezji i fuzji izolowanych gamet, są jednak zbieżne bez względu na wykorzystaną technikę zapłodnienia *in vitro*. Wszystkie więc przedstawione w artykule metody przyczyniły się do lepszego poznania na poziomie komórkowym przebiegu syngamii u roślin kwiatowych.

Tabela 1. Porównanie przebiegu zapłodnienia komórki jajowej *in vitro* przy użyciu różnych metod fuzji izolowanych gamet roślin kwiatowych.

	Elektrofuzja	Fuzja indukowana jonami wapnia		Fuzja indukowana 17,5 % PEG[a]
		5 mM Ca^{2+}	50 mM Ca^{2+}	
Gatunek	*Zea mays*			*Nicotiana tabacum*
Sposób kontaktowania	dielektroforeza	mechaniczny (manualnie przy pomocy mikroigieł)		
Czas przylegania gamet	kilka sekund	2–6 min	10–30 min	3–15 min
Czas fuzji gamet	< 1 s	< 10 s	< 1 s	< 1–3 s
Początek reorganizacji protoplastu	kilka minut			kilka sekund[b]
Ruch jądra plemnikowego	< 10 min	20 min	brak danych	
Kariogamia	od 45 min	do ok. 20 h	35 min–46 h	brak danych
Podziały zygoty	po 2,5–3 dniach	brak danych	po 40–60 h	po 3 dniach
Efekty podziałów zygoty	mikrokalus i regeneracja roślin	brak danych	mikrokalus	brak danych
Wydajność fuzji	79%	97%	90%	73%

[a]PEG = glikol polietylenowy; [b]dokładniejsze obserwacje (video-enhanced microscopy)

CO NOWEGO WIEMY O ZAPŁODNIENIU Z DOŚWIADCZEŃ *IN VITRO* ?

Nowe informacje o zapłodnieniu u Angiospermae są konsekwencją rozwoju w ostatnim ćwierćwieczu technik izolowania komórek plemnikowych z ziaren pyłku i gamet żeńskich z tkanek organów żeńskich (FAURE i współaut. 1994b, DUMAS i FAURE 1995, KRANZ i DRESSELHAUS 1996). Główną zaletą fuzji gamet *in vitro* jest fakt, że zapłodnienie jest bezpośrednio obserwowane oraz można proces ten kontrolować i manipulować nim. Izolowane komórki rozrodcze mogą być też zbierane do badań molekularnych. Prezentowane poniżej badania dotyczą głównie komórki jajowej. Komórki centralne łatwo uszkodzić podczas mikromanipulacji, stąd prace nad nimi są nieliczne. Dotychczas nie udało się odtworzyć *in vitro* przebiegu podwójnego zapłodnienia — izolowane komórki jajowe lub centralne ulegały zapłodnieniu oddzielnie, w niezależnych eksperymentach.

Na poziomie komórkowym pierwszym zdarzeniem jakie towarzyszy fuzji gamet kukurydzy, jest wzrost cytozolowego stężenia Ca^{2+} (DIGONNET i współaut. 1997, ANTOINE i współaut. 2000) podobnie, jak podczas fuzji gamet zwierzęcych i zapłodnienia u brunatnic (WHITAKER i SWANN 1993, BERGER i BROWNLEE 1993). Ostatnie badania nad zapłodnieniem *in vitro* u tytoniu (SUN i współaut. 2000) pokazały, że komórka plemnikowa i protoplast komórki jajowej przylegają do siebie (tzn. nie można ich rozłączyć poruszając mikroigiełką) dopiero po pewnym czasie od zetknięcia się. Taki ścisły kontakt gamet związany jest z utworzeniem pasma cytoplazmy, które łączy miejsce przylegania komórki plemnikowej i żeńską cytoplazmę okołojądrową. Następnie obserwowano większą aktywność cytoplazmy komórki jajowej wyrażoną długodystansowym ruchem organelli. Po fuzji gamet kukurydzy pod wpływem jonów wapnia lub impulsu elektrycznego zachodzi wyraźna kontrakcja komórki jajowej będąca wynikiem modyfikacji jej cytoszkieletu i powierzchni (KRANZ i współaut. 1991a, KRANZ i LÖRZ 1994, ANTOINE i współaut. 2000). Jednak ważny problem, szeroko badany u zwierząt, pozostaje nadal nierozwiązany u roślin — czy wzrost stężenia cytozolowego Ca^{2+} jest konieczny i/lub wystarczający, aby aktywować komórkę jajową i rozpocząć rozwój organizmu?

Innym podobieństwem do zapłodnienia u zwierząt jest blokada polispermii odkryta podczas zapłodnienia *in vitro* u kukurydzy. Druga komórka plemnikowa nie może połączyć się z zapłodnioną *in vitro* komórką jajową już 45 s

po fuzji z pierwszym plemnikiem (FAURE i współaut. 1994a). Resynteza ściany komórkowej może brać udział w blokowaniu polispermii analogicznie, jak wytworzenie błony zapłodnieniowej odpowiadające za powolną blokadę polispermii u zwierząt. Jak wykazali KRANZ i współaut. (1995), pierwsze elementy nowej ściany komórkowej pojawiają się w zapłodnionej *in vitro* komórce jajowej kukurydzy już 30 s po fuzji gamet. Aktualnie badane są elektryczne właściwości błon komórkowych w gametach roślinnych, aby stwierdzić czy zjawiska elektrofizjologiczne uczestniczą w wytworzeniu wczesnej blokady polispermii u roślin podobnie, jak podczas zapłodnienia u zwierząt.

Dotychczasowe badania mikroskopowe nad zapłodnieniem wskazywały, że u różnych roślin fuzja gamet *in vivo* jest szybka (rzędu minut) i zachodzi dość krótko po uwolnieniu plemników do woreczka zalążkowego (RUSSELL 1992). Indukowane jonami wapnia zapłodnienie *in vitro* dostarczyło dokładnych danych o tempie plazmogamii (por. Tabela 1). Elektrofuzja gamet u kukurydzy umożliwiła precyzyjne zbadanie kinetyki kariogamii w zapłodnionej komórce jajowej (FAURE i współaut. 1993). Już 20 min po fuzji gamet jądra męskie i żeńskie przylegały do siebie i po dalszych 25–40 min zlewały się. Powstające jądro zygoty zawierało dwa jąderka przez 18–46 h po elektrofuzji gamet, a podział zygoty *in vitro* zachodził po 40–60 h (KRANZ i DRESSELHAUS 1996). Natomiast u kukurydzy *in vivo*, kariogamia zaczynała się 12 h po zapyleniu, dwa jąderka były widoczne przez ponad 5–8 h, a podział zygoty następował 20–24 h po wniknieciu łagiewki pyłkowej do gametofitu żeńskiego (MÓL i współaut. 1994). Ponadto operowanie izolowanymi komórkami jajowymi i zygotami pozwoliło określić poziom DNA w gametach przed i w trakcie zapłodnienia (MOGENSEN i HOLM 1995, MOGENSEN i współaut. 1995): jądra plemnikowe i jądra komórek jajowych mają 1C DNA podczas kariogamii, a synteza DNA (faza S cyklu komórkowego) zachodzi podczas okresu dojrzewania zygoty, kiedyś zwanego „okresem spoczynkowym".

Inaczej niż u zwierząt (VACQUIER 1998), nie zidentyfikowano jeszcze u roślin cząsteczek biorących udział w interakcji plemnik–komórka jajowa. Poszukiwanie ich na podstawie analogii z cząsteczkami innych organizmów może być nieskuteczne, ponieważ cząsteczki biorące udział w procesach reprodukcyjnych w poszczególnych grupach taksonomicznych mogą znacznie różnić się między sobą (VACQUIER 1998). Identyfikacja takich cząsteczek jest ważna, aby zrozumieć w jaki sposób aktywowane są komórki żeńskie u roślin oraz, aby znaleźć różnice między zapłodnieniem komórki jajowej i komórki centralnej. Pozwoliłoby to też określić jak dalece różnią się od siebie mechanizmy zapłodnienia u roślin i zwierząt. W rozszyfrowaniu molekularnego podłoża zapłodnienia u roślin, ważną rolę odegrają w najbliższej przyszłości techniki molekularne w powiązaniu z nowoczesnymi metodami mikroskopii (np. immunofluorescencja) i mikromanipulacji komórkowej. Przeszukiwanie utworzonych niedawno bibliotek cDNA pozwoliło opisać wiele klonów ulegających specyficznej ekspresji po zapłodnieniu izolowanej komórki jajowej kukurydzy (KRANZ i DRESSELHAUS 1996), oraz w izolowanych komórkach jajowych lub centralnych pszenicy (SPRUNCK i współaut. 2003), a także geny ulegające specyficznej ekspresji w komórkach plemnikowych lilii i tytoniu (XU i współaut. 1999, 2002). Większość tych klonów nie była uprzednio znana i dalsze badania są konieczne, aby zrozumieć rolę tych nowo odkrytych genów. Niektóre z nich zidentyfikowano dla komórek jajowych i zygot kukurydzy. Są to geny kodujące kalretikulinę, czynnik inicjujący translację eIF-5a, 4 białka rybosomalne, 3 cykliny oraz geny zawierające MADS-box. Wyniki te wskazują, że u roślin wyższych aktywacja genów zygotycznych następuje tuż po zapłodnieniu, a pierwszy cykl komórkowy zygoty jest inaczej regulowany niż w komórkach somatycznych. Prace te podsumowali i dokładniej opisali PRZYWARA i POPIELARSKA (1999). Spośród blisko 140 klonów specyficznych dla komórek woreczka zalążkowego pszenicy ok. 65 % koduje różne enzymy metaboliczne, białka rybosomalne, białka szoku termicznego i histony (SPRUNCK i współaut. 2003). Scharakteryzowanie przez XU i współaut. (1999) genu *LGC1* może okazać się istotne dla określenia molekularnych mechanizmów dojrzewania komórek plemnikowych i rozpoznawania się gamet podczas podwójnego zapłodnienia, ponieważ produkt tego genu lokuje się na powierzchni komórek plemnikowych. Ostatnie badania nad izolowanymi gametami kukurydzy sugerują, że oligosacharydy wchodzące w skład glikoprotein błon komórkowych mogą mieć znaczenie w przebiegu procesu zapłodnienia — znaleziono

różnice między resztami cukrowymi glikoprotein komórek plemnikowych, jajowych i centralnych, przed i po zapłodnieniu (SUN i współaut. 2002). U jeżowców interakcja bindyny, hydrofobowego białka plemnika, z glikoproteiną błony żółtkowej jaja odpowiada za gatunkowo specyficzne rozpoznanie gamet, ich połączenie i aktywację jaja (WHITAKER i SWANN 1993).

W porównaniu z omówionymi wyżej wynikami badań dotyczących komórek jajowych i zygot, badania nad zapłodnieniem *in vitro* komórki centralnej prezentują się bardzo skromnie. KRANZ i współaut. (1991b) dokonali pierwszej elektrofuzji protoplastu komórki centralnej i komórki plemnikowej. Znana jest jednak tylko jedna praca (KRANZ i współaut. 1998), w której zapłodniona *in vitro* komórka centralna kukurydzy rozwijała się tworząc tkankę przypominającą bielmo. Podczas kariogamii jądro plemnikowe łączyło się z jednym z jąder biegunowych lub z jądrem wtórnym, podobnie jak przy zapłodnieniu *in vivo*, a ściany komórkowe tej tkanki zakładały się dośrodkowo, jak w typowym bielmie jądrowym.

Mimo wielkiego postępu prac nad zapłodnieniem u roślin okrytonasiennych, przed młodymi embriologami dysponującymi szerokim wachlarzem technik molekularnych i komórkowych stoi jeszcze wiele zadań. Głównym wyzwaniem dla nowoczesnej embriologii roślin będzie w najbliższych latach ustalenie jak dobrze zapłodnienie izolowanych gamet *in vitro* odzwierciedla procesy zachodzące *in vivo* w roślinie oraz, czy procedury stosowane w badaniach *in vitro* pozwolą w pełni zrozumieć procesy komórkowe mające miejsce podczas zespolenia gamet Angiospermae. Konieczne wydaje się równoległe rozwijanie badań nad izolowanymi gametami oraz szerokich analiz molekularnych, fizjologicznych i cytologicznych na komórkach *in situ*, tzn. zlokalizowanych w ich naturalnym środowisku tkankowym.

IN VITRO FERTILIZATION (IVF) IN FLOWERING PLANTS

S u m m a r y

This review deals with the recent progress in studies on double fertilization in angiosperms. It briefly presents the IVF-methods and their impact on solving some questions asked by plant embryologists. In the past decade, electrofusion, Ca^{2+}-mediated or PEG-mediated fusion of plant gametes, as well as molecular and immunocytological studies on isolated sperm cells, egg cells, central cells and zygotes, yielded very important new results concerning fertilization in higher plants using maize as a model plant. The first of cellular events that occurs after gamete fusion is an increase of cytosolic Ca^{2+} concentration, known already in animals but found only recently in flowering plants. Egg cytoplasm activation appears to follow also the fusion of plant gametes but still needs to be demonstrated that the rise of cytosolic calcium is necessary and/or sufficient for the egg activation. Another similarity between the course of fertilization in plants and animals is the block to polyspermy. This was shown to occur in maize by Ca^{2+}-mediated gamete fusion *in vitro* and possibly depends on resynthesis of the egg cell wall. If an early block at the membrane level also exists, as in animals, needs to be elucidated. Maize sperm and egg electrofusion gave precise data on the karyogamy kinetics in plants, and studies on DNA content in isolated eggs and zygotes proved that the DNA synthesis occurs after gamete fusion, i.e. during zygote maturation. Unlike in animals, molecules responsible for sperm–egg interactions have not yet been identified. However, several sperm-, egg- and zygote-specific DNA sequences were found in maize and the very recent data suggest that the glycoproteins of tobacco gamete membranes might be involved in fertilization. Despite of this tremendous work done on isolated gametes, the question remains open if double fertilization is determined or random.

LITERATURA

ANTOINE A.-F., FAURE J.-E., CORDEIRO S., DUMAS C., ROUGIER M., FEIJO J. A., 2000. *A calcium influx is triggered and propagates in the zygote as a wavefront during in vitro fertilization of flowering plants.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 10643–10648.

BERGER F., BROWNLEE C., 1993. *Ratio confocal imaging of free cytoplasmic calcium gradients in polarising and polarised Fucus zygotes.* Zygote 1, 9–15.

CARLSON W. R., ROSEMAN R. R., 1992. *A new property of the maize B chromosome.* Genetics 131, 211–223.

DIGONNET C., ALDON D., LEDUC N., DUMAS C., ROUGIER M., 1997. *First evidence of a calcium transient in flowering plants at fertilization.* Development 124, 2867–2874.

DUMAS C., FAURE J.-E.,1995. *Use of in vitro fertilization and zygote culture in crop improvement.* Curr. Opin. Biotechnol. 6, 183–188.

FAURE J.-E., MOGENSEN H. L., DUMAS C., LÖRZ H., KRANZ E., 1993. *Karyogamy after electrofusion of single egg and sperm cell protoplasts from maize: cytological evidence and time course.* Plant Cell 5, 747–755.

FAURE J.-E., DIGONNET C., DUMAS C., 1994a. *An in vitro system for adhesion and fusion of maize gametes.* Science 263, 1598–1600.

FAURE J.-E., DIGONNET C., MÓL R., MATTHYS-ROCHON E., DUMAS C., 1994b. *In vitro pollination and fertilisation in maize (Zea mays L.): technical procedures and prospects for the dissection of the double fertilisation process.* Plant Sci. 104, 1–10.

HIGASHIYAMA T., 2002. *The synergid cell: attractor and acceptor of the pollen tube for double fertilization.* J. Plant Res. 115, 149–160.

HIGASHIYAMA T., KUROIWA H., KUROIWA T., 2003. *Pollen-tube guidance: beacons from the female gametophyte.* Curr. Opin. Plant Biol. 6, 36–41.

HU S. Y., 1998. *Centenary on S.G. Navashin's discovery of double fertilization: retrospects and prospects.* Acta Bot. Sin. 40, 1–13.

HUANG B. Q., RUSSELL S. D., 1992. *Female germ unit: organization, isolation, and function.* Int. Rev. Cytol. 140, 233–293.

JENSEN W. A., 1998. *Double fertilization: a personal view.* Sex. Plant Reprod. 11, 1–5.

KEIJZER C. J., REINDERS M. C., LEFERINK-TEN KLOOSTER H. B., 1988. *A micromanipulation method for artificial fertilization in Torenia.* [W:] *Sexual reproduction in higher plants.* CRESTI M., GORI P., PACINI E. (red.). Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 119–124.

KOVÁCS M., BARNABÁS B., KRANZ E., 1994. *Electro-fused isolated wheat (Triticum aestivum L.) gametes develop into multicellular structures.* Plant Cell Rep. 15, 178–180.

KNOX R. B., SINGH M. B., 1987. *New perspectives in pollen biology and fertilization.* Annals Bot. 60 (Suppl. 4), 15–37.

KRANZ E., 1992. *In vitro fertilization of maize mediated by electrofusion of single gametes.* [W:] *Plant Tissue Culture Manual, E1.* LINDSEY K. (red.) Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1–12.

KRANZ E., LÖRZ H., 1993. *In vitro fertilization with isolated, single gametes results in zygotic embryogenesis and fertile maize plants.* Plant Cell 5, 793–743.

KRANZ E., LÖRZ H., 1994. *In vitro fertilisation of maize by single egg and sperm cell protoplast fusion mediated by high calcium and high pH.* Zygote 2, 125–128.

KRANZ E., DRESSELHAUS T., 1996. *In vitro fertilization with isolated higher plant gametes.* Trends Plant Sci. 1, 82–89.

KRANZ E., BAUTOR J., LÖRZ H., 1991a. *In vitro fertilization of single, isolated gametes of maize mediated by electrofusion.* Sex. Plant Reprod. 4, 12–16.

KRANZ E., BAUTOR J., Lörz H., 1991b. *Electrofusion-mediated transmission of cytoplasmic organelles through the in vitro fertilization process, fusion of sperm cells with synergids and central cells, and cell reconstitution in maize.* Sex. Plant Reprod. 4, 17–21.

KRANZ E., VON WIEGEN P., LÖRZ H., 1995. *Early cytological events after induction of cell division in egg cells and zygote development following in vitro fertilization with angiosperm gametes.* Plant J. 8, 9–23.

KRANZ E., VON WIEGEN P., QUADER H., LÖRZ H., 1998. *Endosperm development after fusion of isolated, simple maize sperm and central cells in vitro.* Plant Cell 10, 511–524.

MATTHYS-ROCHON E., MÓL R., HEIZMANN P., DUMAS C., 1994. *Isolation and microinjection of active sperm nuclei into egg cells and central cells of isolated maize embryo sacs.* Zygote 2, 29–35.

MOGENSEN H.L., HOLM P. B., 1995. *Dynamics of nuclear DNA quantities during zygote development in barley.* Plant Cell 7, 487–494.

MOGENSEN H.L., LEDUC, N., MATTHYS-ROCHON E., DUMAS C., 1995. *Nuclear DNA amounts in the egg and zygote of maize (Zea Mays L.).* Planta 197, 641–645.

MÓL R., 1995. *Preferencyjne zapłodnienie u okrytozalążkowych – co mówią fakty?* [W:] *Szata roślinna Polski w procesie przemian. Materiały konferencji i sympozjów 50 Zjazdu PTB.* MIREK Z., WÓJCICKI J. J. (red.). Wydawn. Inst. Botaniki PAN, Kraków, 277.

MÓL R., MATTHYS-ROCHON E., DUMAS C., 1994. *The kinetics of cytological events during double fertilization in Zea mays L.* Plant J. 5, 197–206.

POPIELARSKA M., PRZYWARA L., 1999. *Postępy w badaniach nad zapłodnieniem u roślin okrytonasiennych (Angiospermae. I. Zapłodnienie in vitro z użyciem izolowanych gamet.* Post. Biol. Kom. 26, 793–807.

PRZYWARA L., POPIELARSKA M., 1999. *Postępy w badaniach nad zapłodnieniem u roślin okrytonasiennych (Angiospermae. II. Biochemiczne i molekulerne aspekty zapłodnienia.* Post. Biol. Kom. 26, 809–825.

ROMAN H., 1948. *Directed fertilization in maize.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 34, 36–42.

ROUGIER M., ANTOINE A.F., ALDON D., DUMAS C., 1996. *New lights in early steps of in vitro fertilization in plants.* Sex. Plant Reprod. 9, 324–329.

RUSSELL S. D., 1984. *Ultrastructure of the sperm of Plumbago zeylanica. 2. Quantitative cytology and three-dimensional reconstruction.* Planta 162, 385–391.

RUSSELL S. D., 1985. *Preferential fertilization in Plumbago: ultrastructural evidence for gamete-level recognition in an angiosperm.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6129–6132.

RUSSELL S. D., 1992. *Double fertilization.* Int. Rev. Cytol. 140, 357–388.

SPRUNCK S., BAUMANN U., SHIRLEY N., LANDGRIDGE P., DRESSELHAUS T., 2003. *Gene expression profiles from isolated egg cells, central cells and pro-embryos of wheat.* [W:] *Plant reproduction: from Mendel to molecular biology.* DUBOVÁ J. (red.). IXth International Conference on Plant Embryology, Vydavatelství MU, Brno, 73.

SUN M. X., KRANZ E, YANG H. Y., LÖRZ H., MOSCATELLI A., CRESTI M., 2002. *Fluorophore-conjugated lectin labelling of the cell surface of isolated male and female gametes, central cells and synergids before*

and after fertilization in maize. Sex. Plant Reprod. 15, 159–166.

SUN M. X., MOSCATELLI A., YANG H.Y., CRESTI M., 2000. *In vitro double fertilization in Nicotiana tabacum (L.): fusion behavior and gamete interaction traced by video-enhanced microscopy.* Sex. Plant Reprod. 12, 267–275.

THEUNIS C. H., PIERSON E. S., CRESTI M., 1991. *Isolation of male and female gametes in higher plants.* Sex. Plant Reprod. 4, 145–154.

TIAN H. Q., RUSSELL S. D., 1997. *Micromanipulation of male and female gametes of Nicotiana tabacum: II. Preliminary attempts for in vitro fertilization and egg cell culture.* Plant Cell Rep. 16, 657–661.

VACQUIER V. D., 1998. *Evolution of gamete recognition proteins.* Science 281, 1995–1998.

WHITAKER M., SWANN K., 1993. *Lighting the fuse at fertilization.* Development 117, 1–12.

XU H. L., SWOBODA I., BHALLA B. L., SINGH M. B., 1999. *Male gametic cell-specific gene expression in flowering plants.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 2554–2558.

XU H. P., WETERINGS K., VRIEZEN W., FERON R., XUE Y. B., DERKSEN J., MARIANI C., 2002. *Isolation and characterization of male-germ-cell transcripts in Nicotiana tabacum.* Sex. Plant Reprod. 14, 339–346.