

JÓZEF BEDNARA Zakład Anatomii i Cytologii Roślin Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej Akademicka 19, 20-033 Lublin e-mail: ancyt@biotop.umcs.lublin.pl

# ROLA SZKIELETU CYTOPLAZMATYCZNEGO W ROZMNAŻANIU ROŚLIN

# WPROWADZENIE

Szkielet cytoplazmatyczny stanowi istotną część cytoplazmy komórek, osiągając zwykle kilkanaście procent wagi wszystkich białek protoplastu. Od około 40. lat jest obiektem intensywnych badań, początkowo ultrastrukturalnych, a później immunocytochemicznych. Istotny postęp w badaniach cytoszkieletu dokonał się wraz z udoskonaleniem czułych metod immunocytochemicznych, zwłaszcza po zastosowaniu dwustopniowej immunolokalizacji z fluorescencyjnymi markerami przeciwciał na poziomie mikroskopu świetlnego oraz koloidalnym złotem, jako uniwersalnym znacznikiem przeciwciał widocznym zarówno w mikroskopie świetlnym, jak i elektronowym. Precyzyjną lokalizację elementów cytoszkieletu uzyskuje się przez działanie na preparat mikroskopowy przeciwciałami przeciwko antygenom, w tym przypadku białkom wchodzącym w skład cytoszkieletu. Przeciwciało I wiąże się wówczas wybiórczo ze strukturami zawierającymi odpowiednie białko, w drugim etapie reakcji do kompleksu przyłącza się jeszcze przeciwciało II zawierające widoczny w mikroskopie marker, lokalizując białka szkieletowe.

Najważniejszymi elementami cytoszkieletu komórek roślinnych są mikrotubule, sztywne, rurkowate struktury o średnicy ok. 26 nm złożone z białka tubuliny, z polarnym uporządkowaniem dwu nieco różnych podjednostek alfa i beta. Innym elementem cytoszkieletu są mikrofilamenty, tworzące włókna o grubości ok. 7 nm będące liniowo-spiralnymi polimerami globularnych, jednakowych podjednostek aktyny. Mikrofilamenty wykazują także kierunkowy porządek polimeryzacji i polarną budowę umożliwiającą uporządkowany transport.

Na powierzchni włókien cytoszkieletu wykrywane są liczne dodatkowe białka, z których kilka ma charakter motoryczny, wykazując zdolność do generowania ruchu. Dla mikrotubul są to białka dyneina i kinezyna, a dla mikrofilamentów aktynowych jest to np. miozyna, występująca także w dużych ilościach w tkance mięśniowej zwierząt. Białka motoryczne umożliwiają przemieszczanie elementów cytoszkieletu względem siebie, przemieszczenia jąder, chromosomów i dużych organelli komórkowych, takich jak plastydy bądź mitochondria, a także przesunięcia małych obiektów, np. pęcherzyków diktiosomalnych lub rozet związanych z budową ścian komórkowych tzw. terminalnych kompleksów syntezy celulozy. Zaskakująco szerokie są możliwości transportowe pojedynczych włókien szkieletowych, np. zdolność do równoczesnego transportu pęcherzyków w przeciwnych kierunkach, za sprawą różnych białek motorycznych: dyneiny, majacej zdolność przesuwania od bieguna dodatniego mikrotubuli do ujemnego, i kinezyny, od bieguna ujemnego do dodatniego.

Dość dobrze poznana została struktura elementów cytoszkieletu komórek soma-

-tycznych, ich skład białkowy oraz wygląd konfiguracji zmieniających się w kolejnych fazach cyklu życiowego komórek. Poznano także część funkcji, poszczególnych kategorii cytoszkieletu. Znane w świecie zwierząt inne elementy cytoszkieletu, np. filamenty pośrednie lub tubulina gamma, występują także w komórkach roślinnych, ale doniesienia o nich w komórkach biorących udział w procesach rozmnażania są bardzo nieliczne.

Zjawisko rozmnażania jest atrybutem wszystkich organizmów żywych. W świecie roślin organizmy prokariotyczne i niektóre jednokomórkowe gatunki eukariotyczne rozmnażają się przez prosty podział mitotyczny na dwie identyczne komórki potomne, co jest formą rozmnażania wegetatywnego. Olbrzymia większość gatunków eukariotycznych, w tym wszystkie rośliny wyższe, mogą rozmnażać się płciowo przechodząc przy tym przemianę pokoleń z dwoma następującymi po sobie poziomami ploidalności chromosomów, haploidalnym – gametofitowym, 1n (z pojedynczym garniturem chromosomów w komórkach) i diploidalnym – sporofitowym, 2n (z podwójnym garniturem). Czas egzystencji kolejnych pokoleń nie jest jednakowy, ale cykl ma stałe punkty graniczne: zapłodnienie, czyli fuzję gamet oraz mejozę. Mejoza zachodzi zwykle tylko w niektórych komórkach sporofitu i prowadzi do wytworzenia haploidalnych zarodników oraz wyrośnięcia z nich gametofitów, wytwarzających męskie i żeńskie gamety.

Wszystkim wspomnianym procesom: podziałom mitotycznym i mejotycznym, zapłodnieniu oraz morfogenezie, towarzyszą zmiany konfiguracji cytoszkieletu, lepiej poznane, gdy chodzi o komórki diploidalne, a słabiej w części dotyczącej mejozy, rozwoju i dojrzewania gametofitów oraz formowania gamet lub szczegółów zapłodnienia.

### KONFIGURACJE CYTOSZKIELETU W CYKLU MITOTYCZNYM

Logicznie będzie zacząć opisy konfiguracji cytoszkieletu od stadium zygoty zapoczątkowującej rozwój diploidalnego pokolenia, w której zachodzą podziały mitotyczne komórek. W cyklu życiowym komórki wyróżnia się 5 konfiguracji cytoszkieletu, dość ściśle związanych z fazami cyklu życiowego. W stadium międzypodziałowym ( $G_1$ , S i  $G_2$  oraz  $G_0$ ) mikrotubule rozmieszczone są w peryferyścianie cznej cytoplazmie tuż przy komórkowej, tworząc luźne spiralne i równoległe układy zwane siecią kortykalną. Następna konfiguracja nosi nazwę pierścienia preprofazowego i pojawia się pod koniec fazy G<sub>2</sub>, ale przed jakimikolwiek oznakami profazy. Preprofazowy pas zajmuje równikową część cytoplazmy miedzy ściana i jadrem komórkowym, dokładnie w płaszczyźnie przyszłego podziału. Pas preprofazowy jest szczególną postacią sieci kortykalnej, ale składa się zarówno z silnie zagęszczonych mikrotubul, jak i mikrofilamentów aktynowych oraz szeregu dalszych komponentów, m.in. zawiera cyklinę Cyc B 1 zm 2-jeden z

enzymów wyzwalających podział mitotyczny. Trzy pozostałe konfiguracje to: wrzeciono kariokinetyczne, fragmoplast i radialny układ stanowiacy okołojądrowy krótki etap przejściowy do sieci kortykalnej. Konfiguracje te związane są odpowiednio: wrzeciono – z rozmieszczeniem chromosomów w płytce metafazowej i rozdziałem chromatyd w anafazie mitozy, fragmoplast – z dystansowaniem jąder potomnych i wytworzeniem przegrody pierwotnej, zaś radialny układ stanowi przejście do konfiguracji sieci kortykalnej, dokonujące się przez depolimeryzację przyjądrowych, ujemnych odcinków mikrotubul.

Kolejne podziały mitotyczne i procesy morfogenezy prowadzą do uformowania rośliny, diploidalnego, sporofitowego pokolenia, które po odpowiednim pobudzeniu zawiązuje kwiaty. Wówczas w workach pyłkowych pręcików (czyli w męskiej części kwiatu) oraz w ośrodku zalążka w słupkach (w żeńskiej części kwiatu) zachodzi mejoza, rozpoczynająca haploidalne pokolenie rośliny zdolne do wytwarzania gamet.

# MEJOZA, MIKROSPOROGENEZA I ROZWÓJ PYŁKU

Plan przebiegu mejozy jest jednakowy u roślin, grzybów i zwierząt, ale występują różnice charakterystyczne dla dużych grup systematycznych oraz różnice gatunkowe. Nierówny jest także czas trwania mejozy, który może wynosić kilka miesięcy (obejmując zimę) lub trwa zaledwie 1-2 doby w optymalnych warunkach temperaturowych. Komórki zdolne potencjalnie do mejozy noszą nazwę archesporialnych i mają stałe położenie; w obrębie pylników – w przypadku męskiej linii, zaś wśród komórek zalążka – w przypadku linii żeńskiej. Worki pyłkowe i ośrodek zalążka pełnią funkcję zarodni męskich bądź żeńskich z różną liczbą komórek męskiego i żeńskiego archesporu. Jest ona olbrzymia w przypadku płci męskiej i niewielka (1 lub kilka komórek) w przypadku płci żeńskiej.

Omawianie procesu rozmnażania w aspekcie cytoszkieletu najłatwiej będzie przedstawić na przykładzie roślin okrytozalążkowych, lepiej poznanych ze względu na ich dostępność, ważność gospodarczą oraz szybkość przebiegu cyklów rozmnażania. Różnice są duże, w porównaniu np. z roślinami nagonasiennymi (wysokimi, niedostępnymi drzewami), u których procesy tworzenia pyłku, zapłodnienia i wytwarzania nasion trwają 2–3 lata, zaś u niektórych paprotników podobne procesy trwają nawet kilka lat.

Procesy rozwoju męskiej i żeńskiej linii komórek generatywnych: mikrosporogeneza i tworzenie pyłku oraz megasporogeneza i formowanie woreczków zalążkowych wykazują istotne różnice, dlatego trzeba je omawiać oddzielnie.

Mejoza rozpoczynająca mikrosporogenezę ma konfiguracje cytoszkieletu zbliżone do mitozy, choć są także istotne różnice. Uderzający jest na przykład brak w mejozie preprofazowego pierścienia, który tworzy się przed mitozą i wyznacza późniejszą płaszczyznę ściany komórkowej, formującej się w telofazie.

Kilkanaście lat temu pierwsze opisy szkieletu tubulinowego w mikrosporogenezie (VAN LAMMEREN i współaut. 1985) dotyczyły roślin jednoliściennych, a wkrótce identyczne konfiguracje szkieletu podał (HOGAN 1987) u dwuliściennych. Dalsze badania ujawniły podobieństwa rozmieszczenia mikrotubul i mikrofilamentów oraz wykazały ich wzajemne zależności funkcjonalne w mejozie (TRAAS i współaut. 1989).

We wczesnej profazie mejotycznej mikrosporocyt traci sieć kortykalną, a w całej objętości cytoplazmy pojawia się tubulina w postaci drobnych ziaren i krótkich mikrotubul. W późniejszej profazie (w diplotenie) nowe mikrotubule pojawiają się wokół jądra w stycznym i radialnym ułożeniu (Ryc. 1), a w diakinezie profazy mejotycznej i w metafazie I, całe pęczki mikrotubul polimeryzują się na kinetochorach biwalentów, tworząc wrzeciono kariokinetyczne (Ryc. 2). W anafazie I widać, że wrzeciono składa się z dwu populacji mikrotubul: kinetochorowych, widocznych w postaci okapów na biegunach oraz luźniej ułożonych mikrotubul polarnych, biegnących między grupami chromosomów homologicznych (Ryc. 3). Później, między dwoma telofazowymi jądrami pojawia się fragmoplast złożony w części z nowo powstałych mikrotubul, a w części z mikrotubul biegunowych będących pozostałością wrzeciona kariokinetycznego (Ryc. 4).

Dalszy przebieg mejozy jest nieco odmienny u gatunków z tzw. cytokinezą równoczesną (w większości roślin dwuliściennych), oraz u gatunków z cytokinezą sukcesywną (w większości jednoliściennych). W pierwszym przypadku, po telofazie I nie zachodzi cytokineza i nie buduje się ściana komórkowa, lecz mikrosporocyt wchodzi bezpośrednio w profazę II i metafazę II. Budują się wrzeciona kariokinetyczne podziału homotypowego mejozy (Ryc. 5, 6). W anafazie w jednej coenocytycznej komórce znajdują się więc cztery grupy chromosomów rozdzielone bardzo wydłużonymi wrzecionami (Ryc. 7). Telofaza II (u roślin z równoczesną cytokinezą) ma szczególne konfiguracje cytoszkieletu. Tworzą się czterobiegunowe fragmoplasty, z mikrotubulami pojawiającymi się zarówno w przestrzeni między jądrami siostrzanymi, jak i jądrami niesiostrzanymi (Ryc. 8). Ostatecznie zachodzi synchroniczna cytokineza oddzielająca ścianami 4 jądra komórkowe, w efekcie czego powstają 4 mikrospory z radialnym okołojądrowym układem mikrotubul (Ryc. 9). Coenocytyczna komórka dzieli się więc na mikrospory według stałego schematu, właściwego mejozie z cytokinezą równoczesną. Listewki nowych ścian zakładają się przy zewnętrznej ścianie mejocytu i buduja ja dośrodkowo, rozdzielając cytoplazmę z jądrami komórkowymi.

W mejozie z cytokinezą sukcesywną, po telofazie I pojawia się ściana komórkowa oddzielająca dwie komórki diady, a metafaza II i telofaza II przebiegają w oddzielnych kompartmentach cytoplazmy. We fragmoplastach dominuje ruch pęcherzyków diktiosomalnych od strefy przyjądrowej do przegrody i jest stała polaryzacja elementów cytoszkieletu. Mikrotubule mają końce dodatnie w części przyśrodkowej, a ujemne bliżej jądra komórkowego, zaś mikrofilamenty mają końce zaostrzone przy jądrach, a tępe przy budującej się ścianie



Ryc. 1–12. Rozmieszczenie mikrotubul w mikrosporocytach i pyłku tytoniu widoczne po reakcji immunocytochemicznej z antytubuliną. Skala liniowa na Ryc. 1–12 – 10  $\mu$ m, na Ryc. 12 – 7  $\mu$ m.

1. Wczesna profaza, mikrotubule ułożone wokół jądra komórki mejotycznej. 2. Metafaza II, wszystkie mikrotubule zebrane w obrębie wrzeciona kariokinetycznego. 3. Anafaza I, późne wrzeciono z okapami mikrotubul kinetochorowych i mikrotubulami biegunowymi (interzonalnymi). 4. Telofaza I, mikrotubule fragmoplastu. 5. Profaza II podziału mejotycznego, zachowane resztki fragmoplastu i budujące się mikrotubule nowych wrzecion. 6. Metafaza II podziału z dwoma wrzecionami. 7. Anafaza II, rozbudowane mikrotubule interzonalne oraz resztki mikrotubul kinetochorowych na końcach wrzeciona. 8. Czterobiegunowy fragmoplast we wczesnej telofazie II. 9. Młode mikrospory z radalnym cytoszkieletem tubulinowym. 10. Starsza mikrospora z acentrycznymi mikrotubulami i bocznie ułożonym jądrem. 11. Pyłek 2-komórkowy z niesymetrycznym fragmoplastem. 12. Kiełkujący pyłek z wrzecionowatą komórką generatywną.

(SCHOPFER i HEPLER 1991). Nie tworzy się wówczas czterobiegunowy fragmoplast, lecz dwa oddzielne, przebiegające między siostrzanymi jądrami ostatniego podziału. Zakładanie ściany dokonuje się odśrodkowo, czyli odmiennie jak w cytokinezie sukcesywnej. Ostatecznie jednak powstaje tetrada mikrospor z radialnie ułożonymi mikrotubulami. Identyczny jest także dalszy rozwój mikrospor w ziarna pyłku (BROWN i LEMMON 1992).

Pierwszą oznaką różnicowania mikrospory jest zakłócenie symetrii mikrotubul, które rozbudowując się z jednej strony powodują przemieszczenie jądra komórkowego w pobliże sporodermy (Ryc. 10). Tam dochodzi do podziału mitotycznego z wytworzeniem nierównych komórek: soczewkowatej małej komórki generatywnej i dużej komórki wegetatywnej (Ryc. 11). Są doniesienia o występowaniu skupień mikrotubul w mikrosporach w miejscu przyszłego usytuowania jądra (przyszły biegun generatywny), ale agregaty takie nie występują u wszystkich gatunków (BROWN i LEMMON 1994) lub wręcz tworzą się na wegetatywnym biegunie (TERASAKA i NIITSU 1995).

Prawdopodobnie, peryferyczne lub przyśrodkowe zagęszczenie cytoszkieletu jest zmienne w czasie i powinno być uważane za niesymetryczne modyfikacje systemu radialnego (VAN LAMMEREN i współaut. 1989).

O polaryzującą rolę w rozwoju pyłku są także podejrzewane filamenty pośrednie (YANG i współaut. 1992), ale nie jest jasne czy współdziałają one z mikrotubulami, mikrofilamentami czy funkcjonują samodzielnie.

W dalszym rozwoju komórka generatywna zmienia kształt z soczewkowatej na wrzecionowaty (Ryc. 12) i w pyłku lub w łagiewce ulega jeszcze jednej mitozie dającej początek dwu komórkom plemnikowym. Wydłużony kształt i wspólne przemieszczanie komórek plemnikowych i jądra wegetatywnego (męskiej jednostki płciowej) w łagiewce ma podłoże cytoszkieletowe.

Zmiana kształtu komórki generatywnej na wrzecionowaty dokonuje się za sprawą formujących się na obrzeżu mikrotubul, biegnących równolegle do jej długiej osi, w sposób podobny do prętów klatki kanarka. Powstaje dwubiegunowa wrzecionowata struktura, ale jeden biegun mocniej zaostrzony opasuje jądro wegetatywne pyłku i mocno łączy się z jego powierzchnią, wymuszając nawet powstanie wklęśnięcia. Po drugiej mitozie powstają dwie komórki plemnikowe, które jednak nie rozdzielają się. Łączy je wspólna, odziedziczona po komórce generatywnej błona, nowo zbudowane mikrotubule fragmoplastu oraz dodatkowo, dużo wcześniej spolimeryzowane mikrotubule kortykalne, które nie depolimeryzują mimo rozpoczęcia mitozy. W zwykłych podziałach mitotycznych, mikrotubule kortykalne znikają we wczesnej profazie, a fragmoplast istnieje zaledwie kilkanaście minut. W przypadku mitozy w komórce generatywnej obydwie konfiguracje mikrotubul istnieją kilkadziesiąt godzin, być może ze względu na pożądany bliski kontakt gamet z jądrem wegetatywnym.

Ziarna pyłku mają uboższy szkielet cytoplazmatyczny niż kiełkujące z nich łagiewki. Przed kiełkowaniem reakcja immunocytochemiczna ujawnia obecność krótkich mikrotubul, występujących w skupieniach lub oddzielnie oraz tubulino-pozytywne ziarnistości. W komórce wegetatywnej młodego pyłku znajdują się także mikrofilamenty aktynowe oraz wykrywane są białka motoryczne – miozyna i kinezyna.

O sukcesie reprodukcyjnym rośliny w tym stadium decyduje szybkość i kierunek wzrostu łagiewki oraz skuteczny transport gamet. Wiadomo, że gamety znajdują się w szczytowej, najmniej zwakuolizowanej części łagiewki i moga przemieszczać się autonomicznie, nawet niezależnie od nurtu cytoplazmy. Z badań immunocytochemicznych wynika, że w cytoplazmie łagiewki istnieje aktynowo-miozynowy system generowania ruchu, a także niezależny system związany z mikrotubulami i białkiem motorycznym – dyneiną (bądź dyneino-podobnym białkiem). Zgodne z tym są także badania ultrastrukturalne. Oglądany w mikroskopie elektronowym pod dużym powiększeniem szkielet mikrotubularny komórek plemnikowych ujawnia niespodziewane szczegóły. W przyściennej cytoplazmie znajdują się mikrotubule ułożone zgodnie z długą osią wrzecionowatej komórki lub nieco spiralnie, w pęczkach po kilkadziesiąt sztuk. Mikrotubule nie tworzą układów koncentrycznych 9+2 typowych dla rzęsek, jakie mają plemniki mszaków, paprotników czy niektórych roślin nasiennych jak np. Ginkgo lub sagowców. Jednak cześć mikrotubul ściśle przylega do siebie tworząc grupy po 2, 3, 4, 5 i 6. Na niektórych mikrotubulach widać boczne ramiona, podobnie jak na ślizgających się względem siebie parach mikrotubul w rzęskach z dyneiną. Układ bocznych ramion na mikrotubulach widziany w mikroskopie elektronowym jest przynajmniej wizualnie podobny do dyneiny i podejrzewany o generowanie ruchów ślizgowych. Dodatkowo w obrazach z mikroskopu konfokalnego żywych łagiewek widać zmiany kształtu komórek plemnikowych, w tym tworzenie wypustek plazmatycznych.

### MEGASPOROGENEZA I FORMOWANIE GAMETOFITU ŻEŃSKIEGO

Badanie przeróżnicowań szkieletu cytoplazmatycznego w megasporogenezie i przy powstaniu gametofitu żeńskiego jest trudniejsze, dlatego znane jest tylko u nielicznych gatunków. Rozwój żeńskiej linii komórek generatywnych dokonuje się na podobnej drodze jak mikrosporogeneza, ale z mejozą w jednej lub kilku komórkach zalążka. Wobec występowania licznych wariantów rozwoju żeńskiej linii komórek generatywnych u roślin, celowe będzie przedstawienie przeróżnicowań cytoszkieletu na przykładzie powstawania monosporowego woreczka zalążkowego typu Polygonum, tj. najpowszechniej występującego, bo aż u ok. 95% gatunków roślin. Mejoza zachodzi najczęściej w zalążkach w układzie liniowym, a nie tetraedrycznym, jak w precikach. Komórka archesporialna, a później megasporocyt wydłużają się szybko w osi mikropylarno-chalazalnej zalążka. Archespor różnicuje się tuż pod epidermą zalążka i tam wchodzi w podział mejotyczny (w zalążkach cienkoośrodkowych), albo wcześniej oddziela jeszcze komórkę przykrywkowa (Ryc. 13), która zamyka megasporocyt w głębi zalążka (w zalążkach gruboośrodkowych) (Ryc. 14, 15). W mejotycznej profazie obserwuje się regularne przemieszczenia jądra komórkowego, które z położenia centralnego (Ryc. 13, 14) przechodzi na stronę bliższa chalazy (Ryc. 15), a później bliżej mikropyle (Ryc. 16, 17). Ruchy te są zależne od szkieletu mikrotubularnego, który rozbudowuje się okresowo po mikropylarnej lub chalazalnej stronie. W każdym przypadku intruzywny wzrost megasporocytu na długość uszkadza połączenia plazmatyczne na bocznej ścianie. Najmniej zmienione pozostają ściany terminalne, chalazalne i mikropylarne, w których plazmodesmy pozostają.

W mejotycznej profazie drożność całej ściany megasporocytu zostaje dodatkowo ograniczona przez warstwę kalozy. Kaloza w zygotenie tworzy dość grubą, ciągłą warstwę, po wewnętrzej stronie ściany megasporocytu. Pod koniec mejotycznej profazy kaloza jednak degraduje się na jednym biegunie; chalazalnym lub mikropylarnym tj. tam, gdzie po mejozie będzie usytuowana megaspora aktywna (Ryc. 18, 19). Selekcja aktywnej megaspory (jednej z czterech) wynika z charakterystycznego wzoru odkładania kalozy (RODKIEWICZ 1970), ale intrygujący problem drożności ścian znalazł wyjaśnienie dopiero po badaniach cytoszkieletu. Mianowicie z badań szkieletu aktynowego wynika, że jest on całkowicie symetryczny aż do metafazy I, kiedy wchodzi w skład wrzeciona oraz tworzy na nim rodzaj żeberkowanej otoczki (Ryc. 20). W żadnym miejscu ściany nie widać aktyny, która wskazywałaby powierzchnie transferowe. Później w telofazie aktyna pojawia się w obrębie fragmoplastu i na chalazalnej ścianie, świadcząc o rozpoczęciu transportu do mejocytu z tej właśnie strony. Dowodem na rzeczywiste istnienie połaczeń plazmatycznych na chalazalnej stronie megasporocytu jest obecność licznych mikrofilamentów aktynowych (Ryc. 21). Otwarcie plasmodesm ma więc miejsce dopiero w połowie mejozy, choć izolacja kalozowa przestała istnieć już w profazie. U niektórych gatunków taka ściana pokrywa się dodatkowo transferowymi wypustkami (Ryc. 22).

Ostatecznie w wyniku mejozy powstają cztery megaspory. W typie rozwojowym Polygonum 3 megaspory degenerują, a jedna, chalazalna, przechodzi 3 cykle mitoz, które dają początek 8 jądrom komórkowym woreczka zalążkowego.

Szkielet cytoplazmatyczny młodego woreczka zalążkowego jest ubogi, praktycznie ogranicza się do figur mitotycznych, wrzecion kariokinetycznych i fragmoplastów. W cytoplazmie jest niewiele mikrotubul i brak zupełnie pierścieni preprofazowych, które tworzyłyby się przed profazami w typowych mitozach. Spekuluje się, że ów brak wynika ze specyfiki procesów morfogenetycznych (podziały jąder bez cytokinez) oraz z charakteru późniejszych ścian komórkowych, bardziej podobnych do przegrody pierwotnej niż celulozowych ścian zwykłych komórek, będących częścią składową tkanek.



Ryc. 13–22. Megasporogeneza w zalążkach *Ornithogalum umbellatum* (Ryc. 13–17), *Gasteria verrucosa* (Ryc. 18–21) i *Epipactis palnstre* (Ryc. 22). Skala liniowa na Ryc. 13–21–10 µm, na Ryc. 22–5 µm.

13. Komórka przykrywkowa i komórka archesporialna przy mikropyle zalążka. 14. Młody megasporocyt z centralnie ułożonym jądrem komórkowym i okołojądrowymi mikrotubulami. 15. Megasporocyt w stadium zygotenu z acentrycznie ułożonym jądrem, usytuowanym bliżej chalazy (strona dolna zdjęcia). 16. Megasporocyt w diplotenie z jądrem komórkowym przesuniętym bliżej mikropyle, z mikropylarnym zagęszczeniem mikrotubul. 17. Ten sam megasporocyt – po fluorochromie DAPI widać diplotenowy stan kondensacji chromosomów z jąderkiem przy mikropyle oraz rozproszone w cytoplazmie nukleoidy mitochondriów i proplastydów. 18. Fluorescencja kalozy w diplotenowym megasporocycie, widać rozrzedzenie otoczki izolującej na biegunie chalazalnym. 19. Rozmieszczenie kalozy w telofazie I mejozy z pełną izolacją mikropylarnej komórki diady i częściowo otwartą chalazalną ścianą drugiej komórki. 20. Megasporocyt w metafazie I z widocznym szkieletem aktynowym na wrzecionie kariokinetycznym. 21. Szkielet aktynowy w telofazie I z zagęszczeniem mikrofilamentów w obrębie fragmoplastu oraz silnym zagęszczeniem przy transferowej, chalazalnej ścianie. 22. Zdjęcie z mikroskopu elektronowego megasporocytu w stadium profazy mejotycznej II. Widać skondensowane chromosomy i wypustki transferowe ściany chalazalnej. Ta część cyklu rozwojowego roślin jest mało zbadana i wymaga pilnego uzupełnienia. Lepiej poznany jest cytoszkielet dojrzałych woreczków zalążkowych, które można badać na skrawkach, jak też *in toto* po mechanicznej lub enzymatycznej izolacji.

W najbardziej powszechnym przypadku, w woreczku powstałym według typu Polygonum znajduje sie 3-komórkowy aparat jajowy przy biegunie mikropylarnym, duża dwujądrowa komórka centralna w środku woreczka i trzy antypody od strony chalazalnej. Aparat jajowy składa się z dwu synergid i komórki jajowej, mających podobne wymiary oraz identyczny gruszkowaty kształt, ale wykazujących odmienną polaryzację i odmienne konfiguracje mikrotubul. W synergidach dominuie podłużny układ mikrotubul (w osi mikropylarno-chalazalnej), z silnym zagęszczeniem w kształcie pędzla przy mikropyle, w pobliżu aparatu włókienkowego. Komórka jajowa i komórka centralna (będące gametami) mają dość ubogi szkielet tubulinowy, o wyglądzie sieci kortykalnej. W komórkach antypod natomiast występują liczniejsze mikrotubule o tangencjalnym i promienistym ułożeniu. Wydaje się, że obecne w gametoficie żeńskim trzy typy komórek – o roli transportowej, generatywnej i troficznej, mają trzy odmienne konfiguracje mikrotubul.

Interesujące jest rozmieszczenie szkieletu aktynowego (YING i współaut. 2000). Liczne mikrofilamenty występują przy aparacie włókienkowym synergid, prawdopodobnie towarzysząc mikrotubulom. Jedna z synergid jest jednak wyraźnie bogatsza w aktynę (Ryc. 23).

Inaczej, bo radialnie są ułożone mikrofilamenty wokół jądra komórki jajowej (Ryc. 24) oraz komórki centralnej (Ryc. 25).

U kilku gatunków roślin poznane są także szczegóły zapłodnienia: wnikanie łagiewki do

synergidy, przeniesienie gamet męskich do komórki jajowej i centralnej oraz pierwsze podziały w zygocie. Sekwencja zdarzeń związanych z podwójnym zapłodnieniem jest zależna od szkieletu aktynowego. Są poglądy, że synergida bogatsza w aktynę degeneruje wcześniej i przy zapłodnieniu ona właśnie przyjmuje łagiewkę. Wówczas po przeciwnej, chalazalnej stronie synergidy buduje sie aktynowa korona (Ryc. 25), która umożliwia przemieszczenie gamet meskich do komórki jajowej i centralnej (HUANG i RUSSELL 1994, RUSSELL 1996). Spekuluje się, że synteza elementów aktynowych w przestrzeni pozakomórkowej jest możliwa dzięki uwolnieniu dużej puli jonów wapnia z zdegenerowanej wakuoli synergidy, współdziałanie aktynowego cylindra (korony) i białek motorycznych (HESLOP-HARRISON i HESLOP-HARRISON 1989) na powierzchni gamet męskich umożliwia ich przemieszczanie i fuzję z gametami żeńskimi. Przebieg zapłodnienia jest znany z badań niewielu gatunków, ale prawdopodobnie zachodzi jednakowo, nawet u gatunków, u których brak synergid, np. u Plumbago zeylandica. Tam aktynowa korona tworzy się w komórce jajowej, co umożliwia zapłodnienie (HUANG i współaut. 1993).

W komórce zygotycznej cytoszkielet aktynowy i tubulinowy, czyli zbudowany z mikrofilamentów i mikrotubul, jest niesymetryczny. Rzutuje to na późniejsze formowanie zarodka z biegunem troficznym – suspensorowym i ściśle merystematycznym – apikalnym biegunem zarodka właściwego (Ryc. 26, 27). Istniejące przy chalazalnym biegunie woreczka zalążkowego antypody mają elementy cytoszkieletu aktynowego rozmieszczone podobnie jak mikrotubule, czyli stycznie i ukośnie (Ryc. 28).

### STRUKTURY WOLNOJĄDROWE

W procesach rozmnażania roślin obserwuje się przypadki rozwoju coenocytycznych wielojądrowych struktur, które są etapami rozwojowymi w powstawaniu gametofitów żeńskich u roślin nago- i okrytozalążkowych, w aposporycznych woreczkach zalążkowych, we wczesnych etapach rozwoju bielma, a wyjątkowo także w rozwoju zarodków (np. u *Peonia*). Zachodzące wówczas szybkie mitozy nie są skojarzone z cytokinezami, przez co powstają przejściowo komórczaki o kilku, kilkuset lub nawet kilku tysiącach jąder komórkowych. Po pewnym czasie zachodzą jednak cytokinezy kończące podziały komórek. Procesy te rozpatrywane od strony konfiguracji cytoszkieletu wyglądają jednakowo, choć dotyczą coenocytów haploidalnych (gametofity), diploidalnych (apomiktyczne woreczki zalążkowe, zarodki *Peonia* i niektóre typy bielma), triploidalnych lub o



Ryc. 23-28. Szkielet aktynowy w gametoficie żeńskim *Galanthus nivalis*. Skala liniowa –  $10 \mu m$ .

23. Mikropylarna część woreczka zalążkowego z synergidami. Fluoryzujące mikrofilamenty skupione głownie przy mikropyle, w miejscu aparatów włókienkowych. Jedna synergida jest bogata w aktynę. 24. Synergidy z zagęszczeniem aktyny przy mikropyle i wysunięta do chalazy komórka jajowa z radialnie ułożonym szkieletem aktynowym. 25. Część komórki centralnej z radialnym ułożeniem aktyny w okołojądrowych strumieniach cytoplazmy oraz cylinder aktynowy przy aparacie jajowym. 26. Wygląd komórki jajowej po zapłodnieniu, a przed pierwszym podziałem zygoty. Więcej aktyny znajduje się w głównej masie cytoplazmy w pobliżu jądra. 27. Obraz młodej zygoty w mikroskopie świetlnym pokazujący aparat włókienkowy i resztki łagiewki pyłkowej (w górnej części zdjęcia) oraz cytoplazmę z jądrem, która wejdzie w skład aplikalnej części zarodka. 28. Szkielet aktynowy w antypodach, widać tangencjonalne i skośne skupienia mikrofilamentów.

wyższym stopniu ploidalności w bielmie różnych typów.

W cyklach podziałowych coenocytów dominującą konfiguracją jest stabilny okołojądrowy układ radialny. Nie obserwuje się szkieletu kortykalnego, ani jego szczególnej postaci – pierścienia preprofazowego. Pojawiają się natomiast dalsze, typowe dla mitozy konfiguracje: wrzeciono kariokinetyczne i fragmoplast. W obrębie fragmoplastów nie powstaje jednak przegroda pierwotna i ściana. Wydaje się, że okołojądrowa część fragmoplastu jest trwalsza niż w typowej mitozie. W ten sposób okołojądrowy radialny układ mikrotubul może utrzymywać jądra w stałej odległości, stabilizując coenocyt (BROWN i współaut. 1994). Znacznie później, po kilku lub wielu cyklach podziałowych zachodzi celularyzacja komórczaka. Gwałtownie wówczas pojawia się nowa generacja fragmoplastów (niezależnie od fazy cyklu jąder komórkowych) tworząca się przy wcześniej istniejącej, granicznej ścianie woreczka zalążkowego. Powstają ostatecznie cylindryczne fragmoplasty obejmujące jądra komórkowe, a potem nowe ściany o takim samym kształcie, przylegające do starej ściany jak komórki plastra pszczelego. Polimeryzacja mikrotubul wchodzących w skład fragmoplastów dokonuje się przez przedłużenie okołojądrowych radialnych mikrotubul. Budujące się ściany pierwszej warstwy są wyłącznie antyklinalne, więc przejściowo tworzą się alweole, niekompletne komórki z otwartą przyśrodkową powierzchnią. Jest charakterystyczne, że zarówno młode coenocytyczne gametofity żeńskie, jak wczesne coenocytyczne stadia rozwoju bielma są podobne cytologicznie; mają jedynie cienką warstwę cytoplazmy o ubogim cytoszkielecie i wielką centralną wakuolę. Dalsze podziały coenocytycznych tworów wypełniające np. gametofity żeńskie nagozalążkowych lub wewnętrzne strefy bielma nie mają już rozdzielonej w czasie kariokinezy i cytokinezy. Ich ściany mogą budować się tuż po mitozie we wszystkich płaszczyznach; także peryklinalnych i skośnych. Najwcześniejsze antyklinalne podziały w bielmie dają początek bardzo regularnej warstwie komórek aleuronowych, wykształcających się w nasionach.

#### PODSUMOWANIE

Rola szkieletu cytoplazmatycznego w rozmnażaniu roślin jest znana tylko fragmentarycznie, ale wobec rosnącej aktualności naukowej tematyki i perspektyw aplikacyjnych luki mogą być szybko uzupełniane.

Przy badaniach szkieletu cytoplazmatycznego komórek stawia się czasem pytanie czy są to badania podstawowe bez szansy na praktyczne zastosowanie, czy mogą mieć znaczenie aplikacyjne.

Zdaniem niektórych biotechnologów jest co najmniej kilka praktycznych zastosowań takich badań.

1. Uzyskiwanie roślin poliploidalnych dokonuje się poprzez traktowanie merystemów wierzchołkowych roślin kolchicyną, uszkadzającą mikrotubularny szkielet wrzeciona kariokinetycznego. 2. Hodowcy androgenicznych zarodków z mikrospor i pyłku *in vitro* stosują wychładzanie pąków kwiatowych lub przegrzewanie pąków dla podniesienia wydajności embriogenezy. Stymulacja następuje przez uszkodzenie cytoszkieletu i zakłócenie przebiegu mitozy. Wówczas zamiast niesymetrycznego podziału na komórkę generatywną i wegetatywną zachodzi mitoza symetryczna rozpoczynająca embriogenezę.

3. Praktyczną wartość mają np. badania cytoszkieletu w przechowywanym przez długi czas pyłku. Pyłek jest wartościowy dopóki komórki plemnikowe utrzymują wrzecionowaty kształt. Odchylenia od optymalnych warunków przechowywania lub działanie stresów uszkadzających cytoszkielet upośledzają żywotność gamet, które stają się wówczas zaokrąglone.

## ROLE OF CYTOSKELETON IN PLANTS REPRODUCTION

#### Summary

This review concerns the role of cytoskeletal elements: microtubules and microfilaments in plants reproduction brought to light by recent electron microscopic and immunofluorescence investigations on mitotic and meiotic cells, as well as on the development of male and female gametophytes. Configurations of the cytoskeleton depend on the cell cycle phase and on morphogenetic processes. The mitotic cell cycle contains five configurations of cytoskeletal fibers: cortical network, preprophase band, mitotic spindle and perinuclear radial arrangement. The cortical network exists at the stages G1, S and G2 but at the end of the G2 the preprophase band exists as a peculiar form of cortical microtubules, predicting the future division plane. The cytoskeleton of meiotic cells doesn't contain the preprophase band configuration. In anthers, the microsporocytes (the male line of generative cells) are divided into tetrads after successive or simultaneous cytokinesis. There are quite dense arrangements of microtubules and microfilaments in cytoplasm of prophase microsporocyte and two other configurations of the cytoskeleton; meiotic spindle and phragmoplast in the metaphase I and telophase I cytoskeleton. Such configurations are doubled in metaphase II and telophase II. The phragmoplast is arranged between sister and non sister nuclei in case of simultaneous cytokinesis, while in two separate bipolar phragmoplasts in case of successive cytokinesis. Before the first mitosis in the microspores an asymmetric microtubular cytoskleleton is developed, resulting in displacement of the nucleus to the cell periphery. Later the first, asymmetric, haploid mitosis forms a much bigger vegetative cell and a smaller generative one. The generative cell changes in the shape from a lens to spherical and to a spindle shape. This cell divides (in pollen grain or in pollen tube) forming two male gametes. The development of female line of generative cells starts in hypodermal cell at the micropylar end of the ovule. The megasporocyte performs random or perinuclear disposition of cytoskeletal elements in mitotic prophase with a temporary concentration during nucleus migration. During the meiosis the tetrad of megaspores is formed with the linear or T shape arrangement. Finally the haploid embryo sac develops with a peculiar cytoskeletal organisation. The pollen tube and gametes entrance is an effect of interaction of the actin cytoskeleton and myosin (or a myosin like protein) on the surface of male gametes.

#### LITERATURA

- BROWN R. C., LEMMON B. E., 1992. Cytoplasmatic domain; a model for spatial control of cytokinesis in reproductive cells of plants. Electron Microsc. Soc. Am. Bull. 22, 48–53.
- BROWN R. C., LEMMON B. E., OLSEN O.-A., 1994. Endosperm development in barley: microtubule involvement in the morphogenetic pathway. Plant Cell. 6, 1241-1252.
- BROWN R. C., LEMMON B. E., 1994. Pollen mitosis in the slipper orchid Cypripedium fasciculatum. Sex. Plant Reprod. 7, 87-94.
- HESLOP-HARRISON J., HESLOP-HARRISON Y., 1989. *Cytochalasin effects on structure and movement in pollen tube of Iris.* Sex. Plant Reprod. 2, 27-37.
- HOGAN C. J., 1987. Microtubule patterns during meiosis in two higher plant species. Protoplasma 138, 126-136.
- HUANG B.-Q., PIERSON E. S., RUSSEL S. D., TIEZZI A., CRESTI M., 1993. Cytoskeletal organisation and modification during pollen tube arrival, gamete delivery and fertilisation in Plumbago zeylanica. Zygote 1, 143–154.
- HUANG B.-Q., RUSSELL S. D., 1994. Fertilization in Nicotiana tabacum: cytoskeletal modification in the embryo sac during synergid degeneration. A hypothesis for short-distance transport of sperm cells prior to gamete fusion. Planta 194, 200-214.
- RODKIEWICZ B., 1970. Callose in cell walls during megasporogenesis in angiosperms. Planta 93, 39-47.
- RUSSEL S. D., 1996. Attraction and transport of male gamets for fertilization. Sex. Plant Reprod. 9, 337-342.

- SCHOPFER C. R., HEPLER P. K., 1991. Distribution of membrans and the cytoskeleton during cell plate formation in pollen mother cells of Tradescantia. J. Cell Sci. 100, 717–728
- TERASAKA O., NIITSU T., 1995. The mitotic apparatus during unequal microspore division observed by a confocal laser scanning microscope. Protoplasma 189, 187-193.
- TRAAS J. A., BURGAIN S., DE VAULX R. D., 1989. The organization of the cytoskeleton during meiosis in egg-plant [Solanum melongena (L.)]: microtubules and F-actin are both necessary for coordinated meiotic division. J. Cell Sci. 92, 541–550.
- VAN LAMMEREN A. A. M., KEIJZER C. J., WILLEMSE M. T. M., KIEFT H., 1985. Structure and function of the microtubular cytoskeleton during pollen development in Gasteria verrucosa (Mil.) M. Duval. Planta 165, 1-11.
- VAN LAMMEREN A. A. M., BEDNARA J., WILLEMSE M. T. M., 1989. Organization of the actin cytoskeleton during pollen development in Gasteria verrucosa (Mill.) M. Duval. Planta 178, 531–539.
- YANG C., XING L., ZHAI Z., 1992. Intermediate filaments in higher plant cells and their assembly in a cell-free system. Protoplasma 171, 44–54.
- YING F., MING Y., BING-QUAN H., HONG-YUAN Y., SZE-YONG Z., O'BRIEN T. P., 2000. Changes in actin organization in the living egg apparatus of Torenia fournieri during fertilization. Sex. Plant Reprod. 12, 315-322.