

Zakład Mikologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie¹
Zakład Anatomii i Cytologii Roślin Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie²

IRENA GIEŁWANOWSKA¹, EWA SZCZUKA²

Mikrotubularny cytoszkielet w sporogenezie *Ophioglossum vulgatum* L.

Microtubular Cytoskeleton in *Ophioglossum vulgatum* L. Sporogenesis

Ophioglossum vulgatum L. (nasieźrzał pospolity) jest drobną paprocią o wysokości 4 do 10 cm z pojedynczym, niepodzielonym liściem. Liść składa się z części asymilującej i zarodnikonośnej. Zarodniki wytwarzane są wewnątrz zebranych w części zarodnikonośnej liścia sporangiach po podziale mejotycznym; a dojrzewają w czerwcu i lipcu. Sporangia *Ophioglossum* mają ścianę zbudowaną z kilku warstw, dlatego paproć ta jest zaliczana do podklasy *Eusporangiate*. *Ophioglossum* ma niezwykle wysoką liczbę chromosomów ($2n=480$) (Strasburger, 1972).

Cytoszkielet (szkielet cytoplazmatyczny) komórek jest przedmiotem badań od ponad stu lat (Bednara, 2000). Już w roku 1880 Strasburger zauważył obecność fibrylarnych struktur (mikrotubul) w komórkach roślinnych, a w 1916 i 1918 roku Farr obserwował podobne fibrylle w komórkach *Nicotiana* i *Magnolia* (Brown i Lemmon, 1991a). Jednak dopiero w latach siedemdziesiątych XX wieku metodami immunofluorescencji, mikroskopii elektronowej i autoradiografii oraz biochemicznymi wykazano, że cytoplazma komórek roślinnych zawiera dwie grupy elementów włóknistych cytoszkieletu: mikrotubule i mikrofilamenty. Mikrotubulom i mikrofilamentom towarzyszą liczne białka enzymatyczne, które uczestniczą w polimeryzacji i depolimeryzacji elementów włóknistych (Vesk i wsp., 1996). Najczęściej badane ze względu na funkcje w procesach komórkowych, mikrotubule są polipeptydami zbudowanymi z heterodimerów α -i β -tubuliny. Budowany przez mikrotubule cytoszkielet jest strukturą bardzo zmienną i dynamiczną. Mikrotubule są polimeryzowane lub depolimeryzowane zależnie od potrzeb wynikających z funkcji komórki w danej fazie życia.

W komórkach roślinnych intensywna polimeryzacja i depolimeryzacja ma miejsce podczas podziałów mitotycznych i mejotycznych.

Ściana dzielącego się sporocytu *Ophioglossum*, podobnie jak i innych paprotników, nie zawiera kalozy (tablice z *Equisetum* w Bednara i wsp., 1986 i *Psilotum* w Tchórzewska i wsp., 1996). Brak kalozy w trakcie sporogenezy powoduje, że sporocyty utrwalają się szybciej i lepiej niż dzielące się mikrosporocyty roślin okrytozalążkowych z grubą, kalozową otoczką. Szybkie utrwalenie materiału pozwala na wyeliminowanie niekorzystnych zmian badanych składników komórek, zwłaszcza mikrotubul. Zjawiska zachodzące podczas mejozy *Pteridophyta* są porównywalne z procesami tworzenia mikrospor czy megaspor roślin nagozalążkowych i okrytozalążkowych. Dlatego też, w prezentowanej pracy, do badania mikrotubularnego cytoszkieletu podczas sporogenezy wybrano paproć *Ophioglossum vulgatum*.

Fot. 1. Pokrój paproci. *Ophioglossum vulgatum* L. 1 : 3
Habit of fern *Ophioglossum vulgatum* L. 1:3

Fot. 2 i 3. Profaza pierwszego podziału mejotycznego. x 1000. Fot. 2. Wczesnoprofazowy sporocyt z fluorescencją tubuliny. Fot. 3. Jądro sporocytu, pokazanego na fot. 2, po barwieniu DAPI
Prophase of the first meiotic division. 1000x. Fig. 2. Early prophase sporocyte with tubulin fluorescence. Fig. 3. Nucleus of sporocyte shown in fig. 2, after DAPI staining

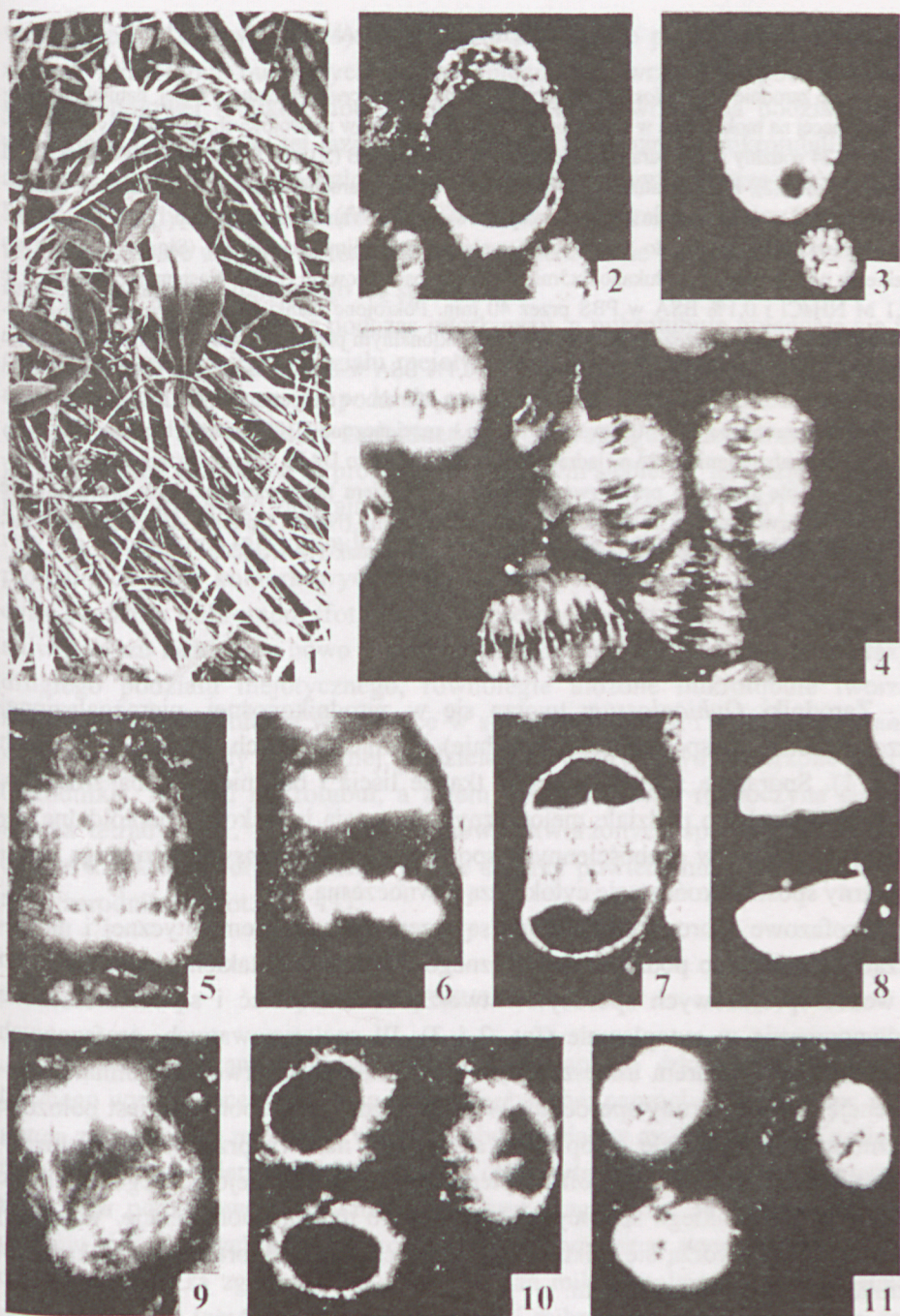
Fot. 4. Metafaza pierwszego podziału mejotycznego. Fluorescencja mikrotubul we wrzecionach podziałowych. x 1000
Metaphase of the first meiotic division. Microtubule fluorescence in the division spindles. 1000x

Fot. 5 i 6. Anafaza pierwszego podziału mejotycznego. x 1000. Fot. 5. Fluorescencja mikrotubul wrzeciona podziałowego. Fot. 6. Chromosomy sporocytu, pokazanego na fot. 5, po barwieniu DAPI
Anaphase of the first meiotic division. 1000x. Fig. 5. Microtubule fluorescence of a division spindle. Fig. 6. Chromosomes of a sporocyte shown in fig. 5 after DAPI staining

Fot. 7 i 8. Posttelofaza pierwszego podziału mejotycznego. x 1000. Fot. 7. Fluorescencja mikrotubul fragmoplastu. Fot. 8. Jądra sporocytu, pokazanego na fot. 7, po barwieniu DAPI
Posttelophase of the first meiotic division. 1000x. Fig. 7. Microtubule fluorescence of a phragmoplast. Fig. 8. Nuclei of a sporocyte shown in fig. 7 after DAPI staining

Fot. 9. Posttelofaza drugiego podziału mejotycznego. Fluorescencja mikrotubul łączących postelofazowe jądra sporocytu. x 1000
Posttelophase of the second meiotic division. Fluorescence of microtubules joining posttelophase nuclei of a sporocyte. 1000x

Fot. 10 i 11. Trzy z czterech nowo utworzonych spor. x 1000. Fot. 10. Fluorescencja tubuliny
Fot. 11. Jądra spor pokazanych na fot. 10, po barwieniu DAPI
Three of four newly formed spores. 1000x. Fig. 10. Tubulin fluorescence. Fig. 11. Nuclei of spores shown in fig. 10 after DAPI staining



MATERIAŁ I METODA

Młode zarodnie *Ophioglossum vulgatum* L. (*Ophioglossaceae*) zbierano z dużej, naturalnej populacji rosnącej na mokrej łące w Olsztynie. Po określeniu stadiów rozwojowych, zarodnie były utrwalane przez 24 godziny w 4% paraformaldehydzie w buforze MSB (50 mM Pipes, 10 mM EGTA i 5 mM MgSO₄) (pH 6,2), w temperaturze pokojowej. Po utrwaleniu zarodnie stopniowo odwadniano, zatapiało w PEG-u i krojono zgodnie z procedurą opracowaną przez Van Lammeren i wsp. (1985).

Skrawki przyklejano do pokrytych 3 aminopropylotrójmetoxysilanem (Sigma-Aldrich Co.) szkiełek podstawowych i płukano 3x5min buforem fosforanowym (PBS). Następnie traktowano je 0,1 M NH₄Cl i 0,1% BSA w PBS przez 40 min. Pokrojone tkanki inkubowano w wilgotnych, szklanych komorach przez 90 min. w 37°C monoklonalnym przeciwciałem – anti-mouse- β tubulin (Sigma-Aldrich Co.) rozcieńczonym 1:100 w 0,1% BSA w PBS. Po płukaniu PBS-em, skrawki poddawano inkubacji drugim przeciwciałem przez 90 min. w temperaturze 90°C. Drugie przeciwciało było sprzężone z FITC (Sigma-Aldrich Co.), rozcieńczone 1:300 buforem blokującym.

W celu zabarwienia DNA w jądrach komórek stosowano DAPI. Po zakończeniu inkubacji dodawano kroplę DAKO i przykrywano skrawki szkiełkiem nakrywkowym. Tak przygotowane obiekty obserwowano w mikroskopie fluorescencyjnym (Nikon Optiphot II). Zróżnicowane, mejotyczne stadia sporocytów fotografowano na filmie Kodak TMAX-400.

WYNIKI

Zarodniki *Ophioglossum* tworzą się w zarodnikonośnej, nierozgałęzionej części liścia w sporangiach (zarodnie) rozmieszczonych w dwóch rzędach (fot. 1). Sporangia zagłębione są w tkance liścia i bocznie ze sobą zrosnięte. W sporangiach po podziale mejotycznym powstają jednakowe, haploidalne zarodniki. Mejoza w grubościennych sporangiach *Ophioglossum* przebiega w regularny sposób i kończy się cytokinezą równoczesną.

Profazowe sporocyty połączone są razem w fazie premeiotycznej i na początku pierwszego podziału mejotycznego. Mikrotubule takich preprofazowych i wczesnoprofazowych sporocytów tworzą delikatną sieć i są rozmieszczone równomiernie w cytoplazmie (fot. 2 i 3). W spolaryzowanych, profazowych sporocytach, z jądrem umieszczonym przy ścianie, obserwowano silną fluorescencję z jednej strony sporocytu. W fazach, gdy jądro sporocytu jest położone centralnie, mikrotubule cytoplazmy są zebrane na dwu przeciwległych biegunkach. W zaawansowanej profazie pierwszego podziału mejotycznego, w strefie okołojądrowej takiego sporocytu obserwowano mocną fluorescencję. W późnej profazie, gdy tworzą się mikrotubule kinetochorowe, fluorescencja mikrotubul znika z cytoplazmy sporocytu.

Pod koniec profazy pierwszego podziału mejotycznego, w diakinezie widoczne są długie sznury mikrotubul w obwodowej części sporocytu. W tym samym stadium mejotycznym i w prometafazie fluorescencja tubuliny jest widoczna przy kinetochorach. Podczas metafazy fluoryzują mikrotubule budujące

wrzeciono podziałowe (fot. 4). W anafazie pierwszego podziału mejotycznego system mikrotubul budujących włókna biegunowe wrzeciona podziałowego ulega stopniowej redukcji (fot. 5 i 6). Mikrotubule wrzeciona podziałowego zanikają w telofazie. W tej fazie mejozy pojawiają się sznury mikrotubul wchodzące w obszar między posttelofazowymi jądrami. W tym obszarze mikrotubule budują rozległy fragmoplast (fot. 7 i 8). W takim, posttelofazowym fragmoplaście mikrotubule ułożone są równolegle względem siebie i prostopadle do płaszczyzny równikowej dzielącego się sporocytu.

Fragmoplast rozpada się podczas interkinezy, a mikrotubule pojawiają się w czasie profazy drugiego podziału mejotycznego przy otoczkach jąder. Podczas metafazy i anafazy drugiego podziału mejotycznego, fluoryzuje tubulina wchodząca w skład obu wrzecion kariokinetycznych drugiego podziału mejotycznego. Wrzeciona te ułożone są prostopadle względem siebie. W telofazie drugiego podziału mejotycznego zanikają mikrotubule włókien biegunowych i kinetochorowych. Ponownie mikrotubule pojawiają się przy powierzchni czterech haploidalnych jąder komórkowych. Jądra tetrady połączone są silnie fluoryzującymi pasmami mikrotubul (fot. 9). Ich fluorescencja jest jednakowo intensywna w pobliżu każdego z nowo utworzonych jąder tetrady. Pod koniec telofazy drugiego podziału mejotycznego, równolegle ułożone mikrotubule tworzą fragmoplast. Mikrotubule wchodzące w skład fragmoplastu są zaangażowane w budowę przegrody pierwotnej, oddzielającej cztery nowo utworzone spory (zarodniki). Rozpad mikrotubul, a zatem i fragmoplastu, rozpoczyna się od środka tetrady spor. Mikrotubule w nowo utworzonych sporach są liczne i bardzo krótkie. Najdłużej zachowywane są przy powierzchni jąder haploidalnych zarodników (fot. 10 i 11).

DYSKUSJA

Trzy obserwowane konfiguracje mikrotubularnego szkieletu cytoplazmatycznego występujące podczas sporogenezy badanej paproci *Ophioglossum vulgatum* zmieniają się regularnie w trakcie obu podziałów mejotycznych. Konfiguracje te: mikrotubularna sieć kortykalna i okołojądrowe układy mikrotubularne, wrzeciona podziałowe (kariokinetyczne) oraz fragmoplast są typowe dla podziałów mejotycznych komórek roślinnych. Otrzymane w wyniku naszych badań obserwacje są zgodne z rezultatami badań mikrotubularnego cytoszkieletu podczas mejozy (zarówno sporogenezy, jak i mikrosporogenezy) u innych gatunków roślin (Van Lammeren i wsp., 1985, Brown i Lemmon, 1991b, 1996, 2000; Genuardo i wsp., 1998; Shiamura i wsp., 1998).

Pod koniec profazy pierwszego podziału mejotycznego *Ophioglossum* obserwowano mocną fluorescencję tubuliny w strefie okołojądrowej. Fluorescencja ta jest silniejsza niż w innych częściach cytoplazmy i we wcześniejszych etapach profazy. Jest ona związana ze wzrostem ilości mikrotubul w strefie okołojądrowej i budową metafazowego wrzeciona podziałowego.

Po pierwszym podziale mejotycznym w sporocytach *Ophioglossum* mikrotubule budują szeroki fragmoplast zajmujący przestrzeń pomiędzy dwoma posttelofazowymi jądrami. Taki posttelofazowy fragmoplast, pod koniec interkinezy, degradowuje się w wyniku depolimeryzacji mikrotubul. Depolimeryzacja rozpoczyna się w środkowej płaszczyźnie fragmoplastu i równikowej płaszczyźnie powstałej po pierwszym podziale mejotycznym diady (dwujądrowy sporocyt). Po pierwszym podziale mejotycznym podczas sporogenezy *Ophioglossum* nie zakłada się przegroda dzieląca sporocyt na dwie oddzielne komórki. W porównaniu z fragmoplastem w dzielących się sukcesywnie mikrosporocytach, fragmoplast w dwujądrowych sporocytach *Ophioglossum* jest bardziej rozległy i ulega degradacji znacznie później. W diadzie *Ophioglossum*, dwa jądra oddzielone są fragmoplastem i dyskową warstwą organelli – plastydów pomieszanych z mitochondriami (Giełwanowska i wsp., 2002). Fragmoplast i warstwa organelli oddziela dwa posttelofazowe jądra. W przeciwieństwie do fragmoplastu, warstwa organelli utrzymuje się w czasie drugiego podziału mejotycznego.

Podczas drugiego podziału mejotycznego, kolejno pojawiają się konfiguracje mikrotubularnego cytoszkieletu: okołojądrowe układy mikrotubularne przy obu jądrach w czasie profazy, dwa wrzeciona kariokinetyczne w anafazie i metafazie oraz rozbudowany fragmoplast po telofazie. Fragmoplast ten oddziela cztery haploidalne jądra. W środkowej warstwie każdej części fragmoplastu zakładają się przegrody dzielące czterojądrowy sporocyt na cztery zarodniki (spory). Dwa pozostałe rodzaje konfiguracji szkieletu mikrotubularnego są identyczne z tymi, które występują podczas sporogenezy w pierwszym podziale mejotycznym.

WNIOSKI

1. Regularna sporogeneza jednakozarodnikowej paproci *Ophioglossum vulgatum* kończy się cytokinezą równoczesną (symultaniczną).
2. Podczas sporogenezy *Ophioglossum vulgatum* występują trzy konfiguracje szkieletu cytoplazmatycznego: mikrotubularna sieć kortykalna i okołojądrowe układy mikrotubularne, wrzeciono kariokinetyczne oraz fragmoplast.

3. Konfiguracje mikrotubularnego szkieletu cytoplazmatycznego *Ophioglossum vulgatum* są wynikiem zmian (przestrzennych i czasowych) mikrotubul dzielącego się sporocytu.

4. Zmiany konfiguracji szkieletu cytoplazmatycznego podczas sporogenezy *Ophioglossum vulgatum* są typowe dla podziałów mejotycznych kończących się cytokinezą równoczesną.

PIŚMIENNICTWO

- Bednara J. 2000. Szkielet cytoplazmatyczny. [w:] Podstawy biologii komórki roślinnej. Wyd. Nauk. UAM, Poznań: 77-92.
- Bednara J., Giełwanowska I., Rodkiewicz B. 1986. Regular arrangements of mitochondria and plastids during sporogenesis in *Equisetum*. *Protoplasma* 130: 145-152.
- Brown R.C., Lemon B.E. 1991a. Pollen development in orchids 1. Cytoskeleton and the control of division plane in irregular patterns of cytokinesis. *Protoplasma* 163: 8-18.
- Brown R.C., Lemon B.E. 1991b. Pollen development in orchids 2. The cytokinetic apparatus in simultaneous cytokinesis. *Protoplasma* 165: 155-166.
- Brown R.C., Lemon B.E. 1996. Nuclear cytoplasmic domains, microtubules and organelles in microsporocytes of the slipper orchid *Cypripedium californicum* A. Gray dividing by simultaneous cytokinesis. *Sex. Plant Reprod.* 9: 145-152.
- Brown R.C., Lemon B.E. 2000. The cytoskeleton and polarization during pollen development in *Carex blanda* (Cyperaceae). *Amer. J. Bot.* 87(1): 1-11.
- Genuardo G., Erico A., Tiezzi A., Conicella C. 1998. α -Tubulin and F-actin distribution during microsporogenesis in a 2n pollen producer of *Solanum*. *Genome* 41: 636-641.
- Giełwanowska I., Szczuka E., Tchórzewska D., Bednara J. 2002. Microtubular cytoskeleton and organelles during sporogenesis of the homosporous fern *Ophioglossum vulgatum* L. *Biologia*.
- Shimamura M., Deguchi H., Mineyuki Y. 1998. Meiotic cytokinetic apparatus in the formation of the linear spore tetrads of *Conocephalum japonicum* (Bryophyta). *Planta* 206: 604-610.
- Strasburger E. 1972. Botanika. PWRiL, Warszawa.
- Tchórzewska D., Brukhin V.B., Bednara J. 1996. Plastids and mitochondria compartment in dividing meiocytes of *Psilotum nudum*. *Acta Soc. Bot. Pol.* Vol. 65, 1-2: 91-96.
- Van Lammeren A.A.M., Keijzer C.J., Willems M.T.M., Kieft H. 1985. Structure and function of the microtubular cytoskeleton during pollen development in *Gasteria verrucosa* (Mill.) H. Duval. *Planta* 165: 1-11.
- Vesek P. A., Vesek M., Gunning B. E. S., 1996. Field emission scanning electron microscopy of microtubule arrays in higher plant cells. *Protoplasma* 195: 168-182.

SUMMARY

Ophioglossum vulgatum L. (*Ophioglossaceae*) meiocytes in sporangia divide into tetrads after regular meiosis completed with simultaneous cytokinesis. During sporogenesis the microtubular

cytoskeleton was investigated using the immunofluorescence method. Three typical configurations of a microtubular cytoskeleton appear during sporogenesis: cortical cytoskeleton and microtubular system at the nuclear envelope, meiotic spindles, and phragmoplasts. The phragmoplast is formed in the undivided cytoplasm between the telophase I nuclei. During telophase I, interzonal microtubules of the first meiotic spindle disappear, and new microtubular arrays extend from the nuclei towards the equatorial plane of the sporocyte. There, these microtubules form the phragmoplast. The second meiotic division takes place simultaneously in both halves of the dyad. The microtubular arrays emanating from the telophase II nuclei form the interconnections of all non-sister and sister nuclei. In the middle plane of these arrays and the organelle layers, the cell plates of the future tetrad are initiated.