ANNALES UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA LUBLIN – POLONIA

VOL. XIII

SECTIO EEE

2003

Zakład Fizjologii Roślin Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie¹ Zakład Anatomii i Cytologii Roślin UMCS w Lublinie²

IRENA GIEŁWANOWSKA¹, EWA SZCZUKA²

Mikrotubularny cytoszkielet w mikrosporogenezie Dactylorhiza majalis (Rchb.) Hunt et Summerh.

Microtubular Cytoskeleton in *Dactylorhiza majalis* (Rchb.) Hunt et Summerh. Microsporogenesis

Synopsis. Zmiany mikrotubularnego cytoszkieletu w komórkach tkanki sporogennej, dzielących się mejotycznie mikrosporocytów i młodych mikrospor stoplamka szerokolistnego Dactylorhiza majalis (Rchb.) Hunt et Summerh. badano metodą immunofluorescencji pośredniej. Przed rozpoczęciem mejozy, tkanka sporogenna podzielona jest grubymi ścianami na skupienia zwane massulami (massulae). W merystematycznych komórkach tkanki sporogennej, delikatna, mikrotubularna sieć kortykalna buduja krótkie, cienkie wiązki mikrotubul. Mejoza zaczyna się w bardzo młodych pąkach kwiatowych i trwa kilkanaście godzin. Wszystkie mikrosporocyty w mikrosporangium rozpoczynają mejozę równocześnie. W metafazie I, synchronizacja faz podziałowych zachowana jest wewnątrz pojedynczych massul; nie ma jej jednak w sąsiadujących ze sobą w jednym mikrosporangium massulach. W mikrosporogenezie kończącej się cytokinezą równoczesną obserwowano trzy konfiguracje mikrotubularnego cytoszkieletu: cytoszkielet kortykalny i układy okołojądrowe mikrotubul, wrzeciona kariokinetyczne oraz fragmoplasty. W cytoplazmie preprofazowych i wczesnoprofazowych mikrosporocytów mikrotubule tworzą delikatną sieć. Pod koniec profazy widoczne są w strefie przyjądrowej, a późnoprofazowych i prometafazowych mikrosporocytach przy kinetochorach. W metafazie i anafazie I mikrotubule budują włókna wrzeciona podziałowego. Po rozpoczeciu posttelofazy I, krótkie mikrotubule przy obu jądrach diady, wydłużają się w kierunku równika mikrosporocytu i budują fragmoplast, dzielący mikrosporocyt na dwie jednojądrowe domeny. Konfiguracje cytoszkieletu w drugim podziale mejotycznym są takie same i zachowują taka samą kolejność występowania jak w czasie I podziału mejotycznego, ale występują w obu domenach diady. W mikrosporach, krótkie, mocno fluoryzujące mikrotubule są rozmieszczone równomiernie. Z mikrospor złączonych w pollinium rozwijają się złączone ziarna pyłku. Dojrzałe ziarna pyłku po przeniesieniu pollinium na znamię kiełkują synchronicznie, a wiązki licznych łagiewek pyłkowych wrastają do zalążni.

Slowa kluczowe – key words: *Dactylorhiza majalis*, mikrosporogeneza – microsporogenesis, cytoszkielet mikrotubularny – microtubular cytoskeleton

WSTĘP

System mikrotubularny w komórkach eukariotycznych odgrywa główną rolę w procesach takich, jak segregacja chromosomów, ruch komórki, budowanie ścian celulozowych, transport pęcherzyków, utrzymanie kształtu i wzrost komórki (Waldin i wsp. 1992; Hasezawa i Nozaki, 1999). System ten buduje cytoszkielet, który jest bardzo zmiennym i dynamicznym składnikiem komórki. Mikrotubule cytoszkieletu są polimeryzowane lub depolimeryzowane zależnie od potrzeb wynikających z funkcji komórki w danej fazie życia (Śnieżko i Tustanowska, 1993). W komórkach roślinnych intensywna polimeryzacja lub depolimeryzacja mikrotubul ma miejsce podczas podziałów mitotycznych i mejotycznych (Giełwanowska i Szczuka, 2002).

Podczas podziału komórek mejotycznych funkcjonują konfiguracje cytoszkieletalne, z których większość jest typowa dla komórek somatycznych. W przeciwieństwie do komórek dzielących się mitotycznie, komórki mejotyczne nie tworzą preprofazowego pierścienia mikrotubul. Trzy mikrotubularne konfiguracje - system mikrotubul w kortykalnej cytoplazmie (cytoszkielet kortykalny lub korowy) i przy błonie jądrowej (radialny układ okołojądrowy), wrzeciona metafazowe pierwszego i drugiego podziału oraz fragmoplasty po pierwszym i drugim podziale są obiektami wielu szczegółowych badań (Van Lammeren i wsp., 1985; Hogan, 1987; Traas i wsp., 1989; Liu i wsp., 1993; Genualdo i wsp., 1998, Brown i Lemmon 1996, 2000; Giełwanowska i Szczuka, 2002; Giełwanowska i wsp., 2003). Konfiguracje te pojawiają się regularnie podczas typowej mejozy kończącej się zarówno sukcesywną jak i równoczesną cytokinezą. W prezentowanej pracy omawiamy rozmieszczenie mikrotubularnych składników cytoszkieletu w komórkach tkanki sporogennej (premejotycznej), dzielących się mejotycznie mikrosporocytach i młodych mikrosporach stoplamka szerokolistnego Dactylorhiza majalis (Rchb.) Hunt et Summerh.

MATERIAŁ I METODY

Młode pąki *Dactylorhiza majalis* (Rchb.) Hunt et Summerh. (*Orchidaceae*) zbierano z dużej naturalnej populacji rosnącej na mokrej łące w Olsztynie.

Immunofluorescencja. Mikrosporangia z mikrosporocytami w odpowiednich stadiach rozwojowych były izolowane z pylników i utwalane 24 godziny w temperaturze pokojowej w 4% paraformaldehydzie w buforze MSB. Skład buforu MSB: 50 mM Pipes, 10 mM EGTA i 5 mM MgSO4 (pH 6,2). Po utrwaleniu mikrosporangia płukano w buforze MSB, odwadniano w roztworach etanolu

o wzrastających stężeniach, zatapiano w PEG-u i krojono zgodnie z procedurą opracowaną przez Van Lammeren i wsp. (1985).

Skrawki przyklejano do szkiełek podstawowych pokrytych 3-aminopropylotrójmetoxysilanem (Sigma-Aldrich Co.) i płukano 3 razy po 5 minut 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-βtubulin (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 37°C. Drugie przeciwciało, rozcieńczone 1:300 buforem było sprzężone z FITC (Sigma-Aldrich Co.).

Do barwienia DNA w jądrach komórkowych użyto DAPI. Przed przykryciem skrawków szkielkiem nakrywkowym dodawano kroplę DAKO. Tak przygotowane objekty obserwowano w mikroskopie fluorescencyjnym (Nikon Optiphot II) i fotografowano na filmie Kodak TMAX-400.

Mikroskopia świetlna. Do obserwacji w mikroskopie świetlnym z jasnym polem widzenia, mikrosporangia utrwalano w 2% aldehydzie glutarowym w 0,05 M buforze kakodylanowym (pH 7,2). Materiał płukano 3x 0,05 M buforem kakodylanowym i stosowano postfiksację 1% OsO4, a następnie odwadniano w roztworach etanolu, acetonu i tlenku propylenu. Po przesyceniu żywicą Spurra (Spurr, 1969), mikrosporangia krojono na 2 µm skrawki i barwiono 1% błękitem aniliny.

WYNIKI

Główka pręcika *Dactylorhiza* składa się z czterech mikrosporangiów budujących dwa pylniki. Młode pylniki otoczone są jednowarstwową epidermą (skórką). Pod nią znajduje się warstwa komórek endotecjum, dwie warstwy pośrednie i tapetum wydzielnicze (sekrecyjne). Tapetum otacza tkankę sporogenną.

Tkanka sporogenna w młodym pylniku *Dactylorhiza* składa się z merystematycznych komórek otoczonych cienkimi ścianami pektynowo-celulozowymi. Przechodzące przez nie plazmodesmy łączą komórki sporogenne i tapetalne. Merystematyczne komórki tkanki sporogennej zawierają gęstą cytoplazmę, a w niej delikatną, mikrotubularną sieć. Wiązki mikrotubul budujące sieć są bardzo krótkie, a ich fluoresencja jest bardzo słaba. Przed rozpoczęciem mejozy tkanka sporogenna podzielona jest grubymi ścianami na skupienia mikrosporocytów zwane massulami (massulae) (fot. 2).

Mejoza zaczyna się w bardzo młodych, okrytych liśćmi (takimi, jakie są pokazane na fot. 1) pąkach kwiatowych. W badanych pylnikach mejoza trwała kilkanaście godzin i odbywała się w połowie maja. W ścianach profazowych mikrosporocytów pojawia się kaloza. Wszystkie mikrosporocyty w mikrosporangium rozpoczynają mejozę równocześnie; pełna synchronizacja trwa do końca profazy pierwszego podziału mejotycznego. W metafazie pierwszego podziału mejotycznego obserwowano synchronizację faz podziałowych wewnątrz pojedynczych massul. Takiej synchronizacji nie było jednak w sąsiadujących ze sobą w jednym mikrosporangium massulach. W mikrosporocytach wypełniających poszczególne massule pojedynczego mikrosporangium obserwowano zmiany szkieletu mikrotubularnego we wszystkich stadiach podziałowych mikrosporogenezy (fot. 3 i 4).

Mikrotubule preprofazowych i wczesnoprofazowych mikrosporocytów tworzą sieć kortykalną. Fluorescencja takich mikrotubul jest mocniejsza w porównaniu do fluorescencji mikrotubul w cytoplazmie komórek tkanki sporogennej. Fluorescencja mikrotubul wzmaga się w trakcie profaży pierwszego podziału mejotycznego, a pod koniec profaży obserwowano mocną fluorescencję w strefie przyjądrowej dzielącego się mikrosporocytu. W tym czasie tworzą się mikrotubule kinetochorowe, a mikrotubule budujące równomierną, kortykalną sieć w cytoplazmie zanikają.

W późnoprofazowych i prometafazowych mikrosporocytach fluoryzują jedynie mikrotubule przy kinetochorach. W metafazie pierwszego podziału mejotycznego mikrotubule budują wydłużone wrzeciono podziałowe. Wrzeciona te ułożone są zgodnie z długą osią w pojedynczych mikrosporocytach, ale pod różnymi kątami względem siebie w sąsiadujących komórkach. Podczas anafazy pierwszego podziału mejotycznego zmniejsza się ilość mikrotubul budujących włókna biegunowe wrzeciona podziałowego; stają się one coraz cieńsze i flouryzują znacznie słabiej. W tym czasie włókna kinetochorowe skracają się. Oba rodzaje włókien zanikają w telofazie pierwszego podziału mejotycznego.

Pod koniec telofazy pierwszego podziału mejotycznego, część mikrotubul posttelofazowego mikrosporocytu buduje fragmoplast między dwoma odtwarzającymi się jądrami. Pozostałe mikrotubule zgrupowane są na dwu biegunach mikrosporocytu. Pod koniec interkinezy i na początku drugiego podziału mejotycznego mikrotubule zgrupowane są przy obu jądrach diady. Konfiguracje cytoszkieletu w drugim podziale mejotycznym są powtórzeniem konfiguracji pierwszego podziału mejotycznego. Zachowują one taką samą kolejność występowania jak w czasie pierwszego podziału mejotycznego, ale mają miejsce w obu częściach diady.

W mikrosporach mikrotubule są rozmieszczone równomiernie i wykazują mocną fluorescencję. Mikrospory *Dactylorhiza* są złączone w duże zespoły – pollinia (pyłkowiny, nazywane masą pyłkową). Połączone są one lepką substancją, utrzymującą pollinia blisko siebie nawet po rozgnieceniu mikrosporangium Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sec. EEE, vol. XIII

Tabl. XIV



I. Giełwanowska, E. Szczuka

Fot. 1. Pokrój storczyka *Dactylorhiza majalis* (Rchb.) Hunt et Summerh. 1: 2. Habit of orchid *Dactylorhiza majalis* (Rchb.) Hunt et Summerh. 1: 2

Fot. 2. Preprofazowe mikrosporocyty w mikrosporangium *D. majalis* zebrane w massulach. Przekrój podłużny przez komorę pyłkowa, błękit toluidyny. x 60

Preprophase microsporocytes in *D. majalis* microsporangium gathered in massulae. Longitudinal section of anther loculus, stained by toluidine blue. x 60

Fot. 3. Konfiguracje szkieletu mikrotubularnego w mikrosporocytach widoczne w mikroskopie fluorescencyjnym. Przekrój poprzeczny przez mikrosporangium. Mikrotubule widoczne po zastosowaniu metody immunofluorescencji pośredniej. x 80

The configurations of microtubular cytoskeleton in mikrosporocytes visible in the fluorescence microscope. Transversal section of mikrosporangium. Microtubules visualized by indirect immunofluorescence method. x 80

Fot. 4. DNA mikrosporocytów widoczne w mikroskopie fluorescencyjnym. Przekrój poprzeczny przez mikrosporangium. DAPI. x 80

DNA of microsporocytes visible in the fluorescence microscope. Transversal section of microsporangium. DAPI treatment. x 80

na szkiełku podstawowym. Z mikrospor złączonych w pollinium rozwijają się również złączone ziarna pyłku. Dojrzałe ziarna pyłku po przeniesieniu pollinium na znamię kiełkują synchronicznie. Podczas badań obserwowano wiązki wyjątkowo licznych łagiewek pyłkowych wrastających do zalążni.

DYSKUSJA

Rodzina Orchidaceae jest dużą i bardzo zróżnicowaną grupą roślin jednoliściennych wykazującą skrajną zmienność i specjalizację struktur związanych z rozmnażaniem. Stanowi ona wyjątkowo cenny materiał do studiowania mikrosporogenezy i cytokinezy, ze względu na niezwykłe bogactwo wzorów rozwoju ziaren pyłku (przegląd typów w Yeung, 1987; Albert i wsp.1989; za Brown i Lemmon, 1991a).

Mejocyty w sporangiach (sporogeneza) i pylnikach (mikrosporogeneza) roślin dzielą się na tetrady po mejozie, która kończy się cytokinezą równoczesną (symultaniczną) lub sukcesywną (kolejną). Cytokineza sukcesywna jest najczęściej spotykana wśród roślin jednoliściennych (*Monocotyledonae*), mszaków (*Bryophyta*), paprotników (*Pteridophyta*) i roślin nagozalążkowych (*Gymno-spermae*). Cytokineza równoczesna występuje głównie u roślin dwuliściennych (*Diocotyledonae*) (Rodkiewicz i wsp. 1996). Mikrosporogeneza większości gatunków z rodziny Orchidaceae (Monocotyledonae) kończy się cytokinezą równoczesną. Jedynie niektóre storczyki np. z dawniej i obecnie przez niektórych systematyków wydzielanej rodziny *Cypripediaceae* tworzą mikrospory w wyniku cytokinezy sukcesywnej (Yeung, 1987, za Brown i Lemmon, 1991a). Badany przez nas storczyk – stoplamek szerokolistny *Dactylorhiza majalis* (Rchb.) Hunt et Summerh. – jest jednym z licznej grupy gatunków storczyków, których mikrosporogeneza kończy się cytokinezą równoczesną.

W komórkach roślinnych w trakcie sporogenezy lub mikrosporogenezy występują trzy konfiguracje cytoszkieletu związane ściśle z fazami podziału mejotycznego: mikrotubularny system w kortykalnej cytoplazmie i przy błonie jądrowej, wrzeciona w metafazie pierwszego i drugiego podziału mejotycznego oraz fragmoplast (Giełwanowska i Szczuka, 2002). Konfiguracje te zmieniają się w regularny sposób w trakcie obu podziałów mejotycznych. Wszystkie wymienione konfiguracje mikrotubularnego cytoszkieletu występują w mikrosporogenezie *Dactylorhiza majalis* i są identyczne z konfiguracjami cytoszkieletalnymi występujacymi zarówno podczas sporogenezy jak i mikrosporogenezy u innych roślin (Van Lammeren i wsp., 1985; Traas i wsp., 1989; Liu i wsp., 1993; Brown i Lemmon 1991b, 1996, 2000; Vesk i wsp., 1996; Genualdo i wsp., 1998, Shiamura i wsp., 1998, Giełwanowska i Szczuka, 2002; Giełwanowska i wsp., 2003).

WNIOSKI

1. W czasie premejozy i profazy mejotycznej mikrosporocyty wykazują synchronizację faz rozwojowych: w kolejnych fazach synchronizacja zachowuje się jedynie w obrębie pojedynczej massuli.

2. Mikrosporogeneza *Dactylorhiza majalis* kończy się cytokinezą równoczesną (symultaniczną).

3. Podczas mikrosporogenezy *Dactylorhiza majalis* występują trzy typowe dla mejozy konfiguracje mikrotubularnego cytoszkieletu: cytoszkielet kortykalny i radialne układy okołojądrowe, wrzeciona kariokinetyczne oraz fragmoplasty po pierwszym i drugim podziale mejotycznym.

PIŚMIENNICTWO

- B r o w n R.C., L e m m o n, B.E. 1991a. Pollen development in orchids. 1. Cytoskeleton and the control of division plane in irregular patterns of cytokinesis. Protoplasma 163: 9-18
- B r o w n R.C., L e m m o n, B.E. 1991b. Pollen development in orchids 2. The cytokinetic apparatus in simultaneous cytokinesis. Protoplasma 165: 155-166.
- B r o w n R.C., L e m m o n, 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.
- B r o w n R.C., L e m m o n, B.E.. 2000. The cytoskeleton and polarization during pollen development in *Carex blanda (Cyperaceae)*. Amer. J. Bot. 87(1): 1-11.

- G e n u a l d o G., E r i c o A., T i e z z i A., C o n i c e l l a C. 1998. α-Tubulin and F-actin distribution during microsporogenesis in a 2n pollen producer of *Solanum*. Genome 41: 636-641.
- G i e ł w a n o w s k a I., S z c z u k a E. 2002. Mikrotubularny cytoszkielet w sporogenezie *Ophioglossum vulgatum* L. Annales UMCS, Sectio EEE, Hortic, 10: 181-188.
- G i e ł w a n o w s k a I., S z c z u k a E., T c h ó r z e w s k a D., B e d n a r a J. 2003. Microtubular cytoskeleton and organelles during sporogenesis of the homosporous fern *Ophioglossum vulgatum* L. Biologia 58: 4-15.
- H a s e z a w a S., N o z a k i H., 1999. Role of cortical microtubules in the orientation of cellulose microfibril deposition in higher- plant cells. Protoplasma 209: 98-104.
- H o g a n C.J. 1987. Microtubule patterns during meiosis in two higher plant species. Protoplasma 138: 126-136.
- L i u Q., G o I u b o v s k a y a I., C a n d e W.Z. 1993. Abnormal cytoskeletal and chromosome distribution in *p0*, *ms4* and *ms6*; mutant alleles of *polymitotic* that disrupt the cell cycle progression from meiosis to mitosis in maize. J. Cell Sci. 106: 1169-1178.
- RodkiewiczB., ŚnieżkoR., FykB., NiewęgłowskaB., TchórzewskaD. 1996. Embriologia *Angiospermae* rozwojowa i eksperymentalna. Wydawnictwo UMCS Lublin.
- S h i m a m u r a M., D e g u c h i H., M i n e y u k i Y. 1998. Meiotic cytokinetic apparatus in the formation of the linear spore tetrads of *Conocephalum japonicum* (Bryophyta). Planta 206: 604-610.
- S p u r r A.R., 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res. 26: 31-43.
- Ś n i e ż k o R., T u s t a n o w s k a A., 1993. Szkielet cytoplazmatyczny nowoczesny problem biologii komórki. Biologia w Szkole 4: 179-189.
- T r a a s J.A., B u r g a i n S., D u m a s d e V a u l x R. 1989. The organization of the cytoskeleton during meiosis in eggplant (*Solanum melongena* L.): microtubules and F-actin are both necessary for coordinated meiotic division. J. Cell Sci. 92: 54 1-550.
- V a n L a m m e r e n A.A.M., K e i j z e r C.J., W i l l e m s e M.T.M., K i e f t H. 1985. Structure and function of the microtubular cytoskeleton during pollen development in *Gasteria vertucosa* (Mill.) H. Duval. Planta 165: 1-11.
- V e s k A.P., V e s k M., G u n n i n g B.E.S. 1996. Field emission scanning electron microscopy of microtubule arrays in higher plant cells. Protoplasma 195: 168-182.
- W a l d i n T.R., E l l i s, J.R., H u s s e y P.J. 1992. Tubulin-isotype analysis of two grass speciesresistant to dinitroaniline herbicides. Planta 188: 258-264

SUMMARY

Changes of microtubular cytoskeleton in *Dactylorhiza majalis* (Rchb.) Hunt et Summerh. in meiotic cells by using immunofluorescence method were investigated. During microsporogenesis completed with simultaneous cytokinesis, three cytoskeletal configurations appear: cortical cyto-skeleton and microbular system at the nuclear envelope, meiotic spindles and phragmoplasts after first and second meiotic divisions. All configurations of the first meiotic division are repeated during the second meiotic division. The second meiotic division takes place in both parts of the dyad.