

DETERMINACJA PŁCI U PAPROCI JEDNAKOZARODNIKOWYCH

SEX DETERMINATION IN HOMOSPOROUS FERNS

Andrzej KAŻMIERCZAK

Katedra Cytofizjologii, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Streszczenie: Paprocie jednakozarodnikowe wytwarzają tylko jeden typ haploidalnych zarodników, jednakże każdy z nich jest potencjalnie obupłciowy i może rozwinąć się w męski lub obojnaczy gametofit. Determinacja płci u tych paproci odbywa się często przy udziale mechanizmów epigenetycznych, w których kluczową rolę spełniają anterydiogeny wydzielane przez obojnacze gametofity i indukujące płęć męską u płciowo niezdeterminowanych osobników. Analizy determinacji płci w gametofitach u *Ceratopteris richardii*, jednego z modelowych gatunków, pozwoliły zaproponować hipotetyczny mechanizm współdziałania przynajmniej ośmiu genów w określaniu rodzaju płci z udziałem endogennego anterydiogenu. Natomiast w gametofitach innego modelowego gatunku paproci, *Anemia phyllitidis*, płęć męska może być indukowana przez kwas giberelinowy, który imituje działanie naturalnego dla tego gatunku anterydiogenu, kwasu anterydiowego. Kwas giberelinowy wywołuje specyficzne, cytomorfologiczne efekty, które pozwoliły na opracowanie trójstrefowego modelu budowy gametofitu *A. phyllitidis*. Ostatnie badania wykazały, że determinacja płci u tego gatunku odbywa się przy współdziale etylenu, który wydaje się być mediatorem działania giberelin w tym procesie. Prawdopodobny mechanizm takiej regulacji zaprezentowano w pracy.

Słowa kluczowe: *Anemia phyllitidis*, anterydiogeny, etylen, kwas giberelinowy, determinacja płci.

Summary: Homosporous ferns produce only one type of haploide spores, however each of them is sexually bipotential and can develop as a male or hermaphrodite gametophytes. Their sex is often determined by an epigenetic mechanism that is responsive to antheridiogens which are secreted by hermaphrodites and promote the development of males from sexually undetermined gametophytes. Analyses of sex determination in the gametophytes of *Ceratopteris richardii*, one of the model fern species, has been defined a hypothetical network of at least eight interacting genes involved in sex expression with connection of endogenous antheridiogen. However, in the gametophytes of *Anemia phyllitidis*, the second important model system in the studies of sex determination, male sex could be induced by gibberellic acid which imitates the action of antheridic acid, the main antheridiogen of that fern. Gibberellic acid produces specific cytomorphological effects which allowed to create the three zone model of *A. phyllitidis* gametophyte structure. The results of recent analyses have revealed that ethylene involved in controlling sex determination in *A. phyllitidis*. It seems to mediate the action of gibberellin in process of sex expression. In this paper the hypothetical mechanism of this activity is proposed.

Key words: *Anemia phyllitidis*, antheridiogens, ethylene, gibberellic acid, sex determination.

WSTĘP

Rozwój roślin odbywa się w dwuetapowym cyklu przemiany pokoleń. Jedno pokolenie to diploidalny sporofit ($2n$) wytwarzający zarodniki, podczas gdy drugie pokolenie generatywne to haploidalny gametofit ($1n$), który wytwarza komórki rozrodcze. U roślin niższych, takich jak glony i mszaki, pokolenie haploidalne jest pokoleniem dominującym. Pokolenie diploidalne zaś to cudzożywne stadium rozwijające się kosztem gametofitu. W toku ewolucji nastąpiło odwrócenie wzajemnej dominacji obu pokoleń, co szczególnie charakter przyjął u roślin okrytonasiennych. U tych roślin żeński i męski gametofit to odpowiednio kilkukomórkowy zalążek lub kielkujące ziarno pyłku, które powstają w wyniku tzw. mejozy pośredniej – sporotycznej [29].

Niezwykle frapującym i ciągle nierozwiązanym zagadnieniem rozwoju roślin jest determinacja płci. Kontrola tego zjawiska odbywa się przy udziale czynników środowiska i za pomocą dwóch systemów: hormonalnego i/lub chromosomalnego. W systemie chromosomalnym geny odpowiedzialne za determinację płci i rozwój organów rozrodczych zebrane są w chromosomy płci (X,Y). Typ kontroli determinacji płci oraz rozwoju organów rozrodczych, w którym chromosom Y aktywnie bierze udział w determinacji płci męskiej, nazywamy heterogametycznością męską [3]. Udział chromosomów w determinacji płci został stwierdzony u roślin dwupiennych, stanowiących około 5% wszystkich roślin kwitnących, takich jak np. bniec (*Silene latifolia*) [3], a także u roślin niższych, takich jak *Marchantia polymorpha* (wątrobowce). U *M. polymorpha* gametofit żeński i męski to dwie haploidalne rośliny różniące się między sobą organami rozrodczymi, z których każda posiada tylko jeden z chromosomów X lub Y wielkością przypominający jego odpowiednik u ssaków. W pokoleniu diploidalnym zaś komórki zawierają chromosomy płci zawsze w kombinacji XY [39].

Często obok chromosomów X i Y decydującą rolę w determinacji płci odgrywa wzajemna zależność pomiędzy liczbą chromosomów żeńskich (X) a liczbą haploidalnych kompletów autosomów (A). Zależność tę wyraża iloraz X/A . Wartość ilorazu wynosząca 0,5 ($X/2A$) wyznacza wskaźnik dla osobników męskich, podczas gdy 1,0 dla osobników żeńskich (np. $2X/2A$ lub $3X/3A$). W przypadku wartości pośrednich np. 0,66 ($2X/3A$) mamy do czynienia z osobnikami hermafrodytycznymi. Taki system determinacji płci typowy dla muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) obserwuje się między innymi u *Rumex palustris* i *Humulus lupulus* [10].

Ze względu na stopień zróżnicowania morfologicznego chromosomy XY można podzielić na trzy grupy: (1) morfologicznie zróżnicowane – heteromorficzne, np. u *M. polymorpha* i *S. latifolia*; (2) o niezauważalnych morfologicznych różnicach – homomorficzne, np. u papai (*Carica papaya*) oraz (3) polimorficzne, np. u szczawiu (*R. acetosa*, XY_1Y_2) lub chmielu (*H. lupulus*, $X_1X_2Y_1Y_2$). Skrajny przypadek polimorfizmu chromosomów płci stwierdzono u zwierząt, np. u dziobaka [10].

Proces determinacji płci i rozwoju organów rozrodczych u roślin jest także pod kontrolą fitohormonów. Udział ich w regulacji determinacji płci stwierdzono między innymi u kukurydzy (*Zea mays*) i ogórka (*Cucumis sativus*). U kukurydzy głównym hormonem biorącym udział w tym procesie są gibereliny, które indukują rozwój płci żeńskiej,

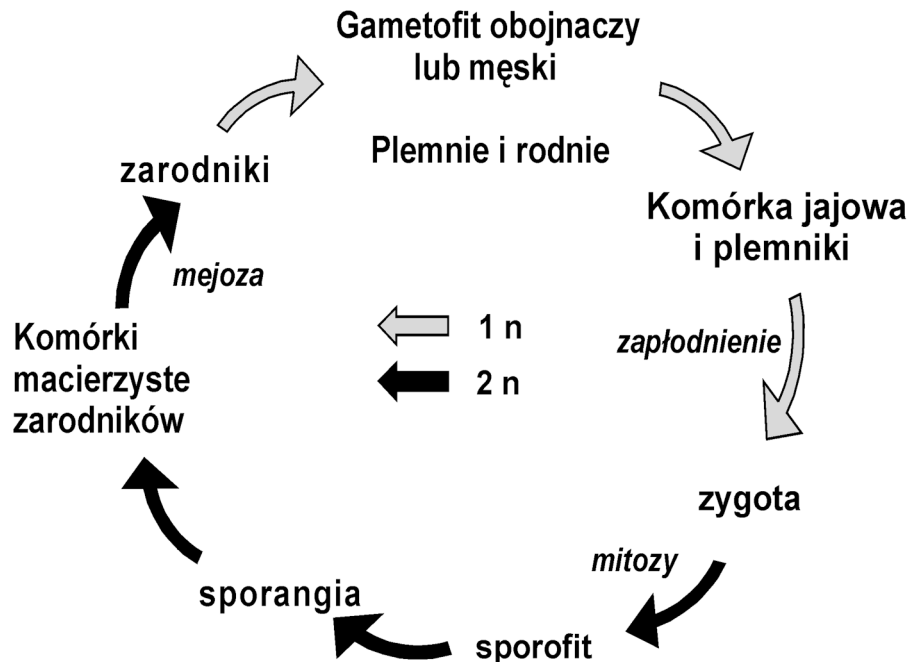
natomiast w proces determinacji płci męskiej są zaangażowane cytokininy [21]. U ogórka rozwój płci męskiej jest indukowany przez gibereliny. Jednakże nadrzędną rolę w tym przypadku pełni etylen, który indukuje rozwój płci żeńskiej [49,51].

Szczególne miejsce w badaniach nad kontrolą procesów rozmnażania zajmują gametofity paproci jednakozarodnikowych, u których kluczowymi czynnikami odpowiedzialnymi za determinację płci i rozwój organów rozrodczych są endogennie występujące, giberelinowe pochodne, anterydiogeny. Udział tych feromonów został wykazany przede wszystkim u paproci z rodziny *Schizaeaceae* [26,48]. Wydaje się jednak, że największy postęp w zakresie poznania mechanizmów rządzących procesem determinacji płci u paproci osiągnięto w przypadku *Ceratopteris richardii* [39] oraz *Anemia phyllitidis* [14–18,26,35]. W przypadku *C. richardii* zaproponowano tzw. epigenetyczny mechanizm regulacji determinacji płci z udziałem endogenego anterydiogenu (A_{CE}). Natomiast w przypadku *A. phyllitidis*, gdzie aktywność anterydiogenów, w tym najbardziej znanego kwasu anterydiowego [28] może być imitowana przez kwas giberelinowy (GA_3) [35], wykazano szereg morfologicznych i cytologicznych cech charakterystycznych dla przebiegu pierwszych etapów procesu anterydiogenezy [15,16]. Ponadto na podstawie badań z wykorzystaniem regulatorów syntezy etylenu (metioniny, kwasu cyklopropylo-1-amino-1-karboksylowego – ACC i kwasu aminooksyoctowego – AOA oraz $CoCl_2$) stwierdzono bezsprzeczny udział tego hormonu w indukowanej przez GA_3 anterydiogenezie [15–18].

1. WZROST I ROZWÓJ GAMETOFITÓW PAPROCI

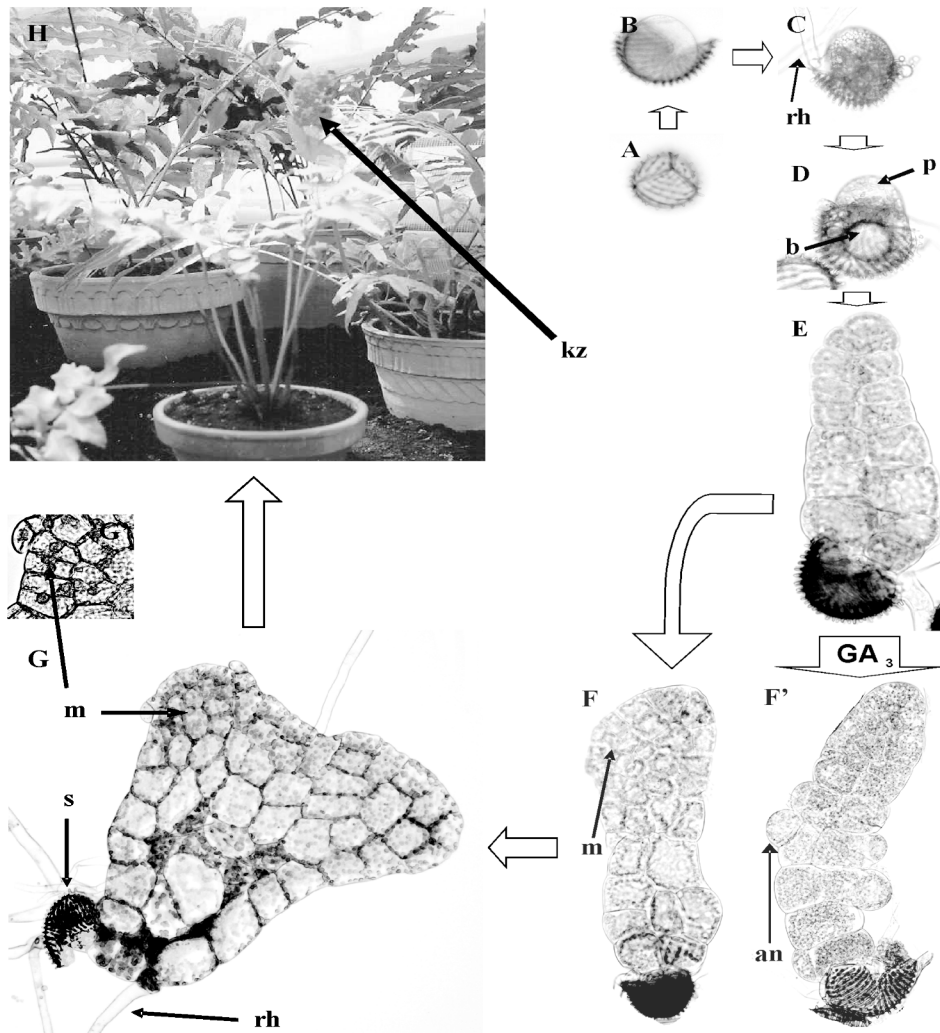
1.1. Kielkowanie zarodników, wzrost gametofitów oraz przemiana pokoleń

Paprocie (*Pteropsida*) obok skrzypów (*Sphenopsida*) i widłaków (*Lycopsida*) należą do gromady paprotników (*Pteridophyta*). Cykl rozwojowy paproci przebiega z zachowaniem przemiany pokoleń, przy czym zarówno pokolenie haploidalne, jak i diploidalne to zielone rośliny, prowadzące samodzielny tryb życia. Gametofity paproci wytwarzają organy rozrodcze, plemniki (anterydia) i rodniki (archegonia), w których powstają w wyniku podziałów mitotycznych odpowiednio komórki jajowe i plemniki, podczas gdy dojrzały sporofit wytwarza w wyniku mejotycznego podziału haploidalne zarodniki (ryc. 1) [25]. Kielkowanie zarodników paproci rozpoczyna się asymetrycznym podziałem komórki zarodnikowej i obejmuje pierwsze trzy lub cztery podziały, które prowadzą do wytworzenia komórki protonemalnej i ryzoidu (ryc. 2A-D). Najprostszy typ kielkowania obserwuje się u takich gatunków, jak np. *A. phyllitidis* czy *C. richardii* [28], które mają tzw. bezchlorofilowe zarodniki, a ich głównym materiałem zapasowym są tzw. lipidowe i białkowe ciała zapasowe [32]. W środowisku wodnym pierwszy podział komórki zarodnikowej *A. phyllitidis* może zachodzić w ciemności lub może być indukowany światłem czerwonym, podczas gdy kolejne podziały komórek plechy prawidłowo przebiegają w świetle białym. Kielkowanie zarodnika obejmuje rozerwanie intyny w miejscu trójdzielnej bruzdy



RYCINA 1. Schemat przemiany pokoleń paproci

aperturowej sporodermy (ryc. 2A), inicjując w tym miejscu dalszy rozwój gametofitu (ryc. 2B). W ciągu trzech lub czterech dni od wysiania, w wyniku podziału komórki zarodnikowej powstaje komórka bazalna i apikalna (ryc. 2C,D). Kolejny podział komórki bazalnej prowadzi do powstania jednokomórkowego ryzoidu, a z komórki apikalnej wyróżnicowuje się komórka protonemalna [26,32]. Podziały komórki protonemalnej i jej komórek potomnych tworzą nitkowatą (filamentową) postać gametofitu (ryc. 2E) [26]. Poprzeczne podziały tych komórek, które mogą być indukowane poprzez światło niebieskie i niekiedy czerwone (jak np. u *A. phyllitidis*), prowadzą do tzw. dwukierunkowego wzrostu gametofitów (ryc. 2F), w wyniku czego wyróżnicowuje się merystem brzeżny plechy (ryc. 2F,G,G'), a w konsekwencji tworzy się sercowate przedrośle [26]. Gametofity paproci jednokomórkowych, w odróżnieniu od różnozarodnikowych, są potencjalnie obupłciowe. Jednakże ekspresja płci i tworzenie organów rozrodczych jest związana z tempem wzrostu i rozwoju poszczególnych gametofitów. Część z nich szybko rośnie i rozwija tzw. merystatyczne gametofity. W wyniku aktywności merystemu powstają fotosyntetyzujące komórki parenchymatyczne oraz merystem środkowy umiejscowiony pomiędzy dwoma skrzydłami sercowatego gametofitu. Merystem różnicuje w kierunku plemni (anterydia), czyli męskich organów rozrodczych wytwarzających plemniki, a następnie w kierunku rodni (archegonia), czyli żeńskich organów rozrodczych wywarzających komórki jajowe. Z wolniej rosnących plech rozwijają się męskie tzw. amerystatyczne gametofity, z anterydiami, które mogą się tworzyć



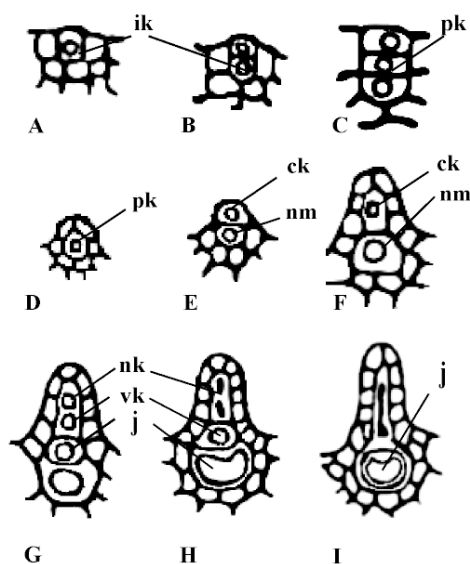
RYCINA 2. Kielkowanie zarodników i rozwój gametofitów *Anemia phyllitidis*. (A) proksymalna powierzchnia zarodnika z trójdzielną bruzdą aperturową; (B) kielkowanie zarodnika obejmujące rozerwanie intyny w miejscu protonemy; (C) powstanie ryzoidu oraz komórki bazalnej i (D) protonemalnej; (E) 12-dniowy gametofit płciowo niezdeterminowany; (F) 21-dniowy gametofit z bocznym merystemem; (F') egzogenne podanie kwasu giberelinowego (GA_3) indukuje przedwczesne tworzenie anterydiów dając w konsekwencji gametofit męski; (G) gametofit z (G') merystemem; (H) dojrzały sporofit z kłosem zarodnionośnym; an – anterydium, b – komórka bazalna, kz – kłos zarodnionośny; m – merystem, p – komórka protonemalna, rh – ryzoid, s – zarodnik

niemal ze wszystkich komórek gametofitu [26]. W wyniku połączenia się w środowisku wodnym komórek rozrodczych powstaje zygota i rozwija się diploidalny sporofit. Sporofit początkowo wrasta w gametofit i staje się samożywną rośliną, podczas gdy gametofit od tego momentu zaczyna obumierać. Sporofit, w zależności od gatunku, rozwija liście z zarodnikami tzw. sporofile oraz liście zielone tzw. trofofile,

natomiast u gatunków paproci, m.in. *A. phyllitidis*, tworzy się charakterystyczny kłós zarodnionośny (ryc. 2H). Stąd też wywodzi się zwyczajowa nazwa dla *A. phyllitidis* „paproć kwitnąca” [25].

1.2. Powstawanie żeńskich organów rozrodczych – archegoniów

Archegonia rozwijają się u 80% gametofitów [26]. Mogą być też jedynymi organami rozrodczymi u szybko rosnących plech. Archegonia powstają zazwyczaj z jednej powierzchniowej inicjalnej komórki, która charakteryzuje się obecnością dużego jądra (ryc. 3A). W wyniku peryklinalnego podziału tej komórki powstają dwie komórki zewnętrzna (mniejsza) i wewnętrzna z dużym jądrem (ryc. 3B). Ta ostatnia dzieli również peryklinalnie i tworzy się zespół trzech ułożonych w rzędzie komórek: zewnętrznej, pierwotnej (pk) i wewnętrznej (ryc. 3C).



RYCINA 3. Schemat powstawania archegoniów na przykładzie *Dryopteris crassirhizoma* – komórki: ck – centralna, ik – inicjalna, j – jajowa, nk – szyjkowo-kanalowa, nm – macierzysta szyjkowo-kanalowa, vk – kanałowo-brzuszną, pk – pierwotna

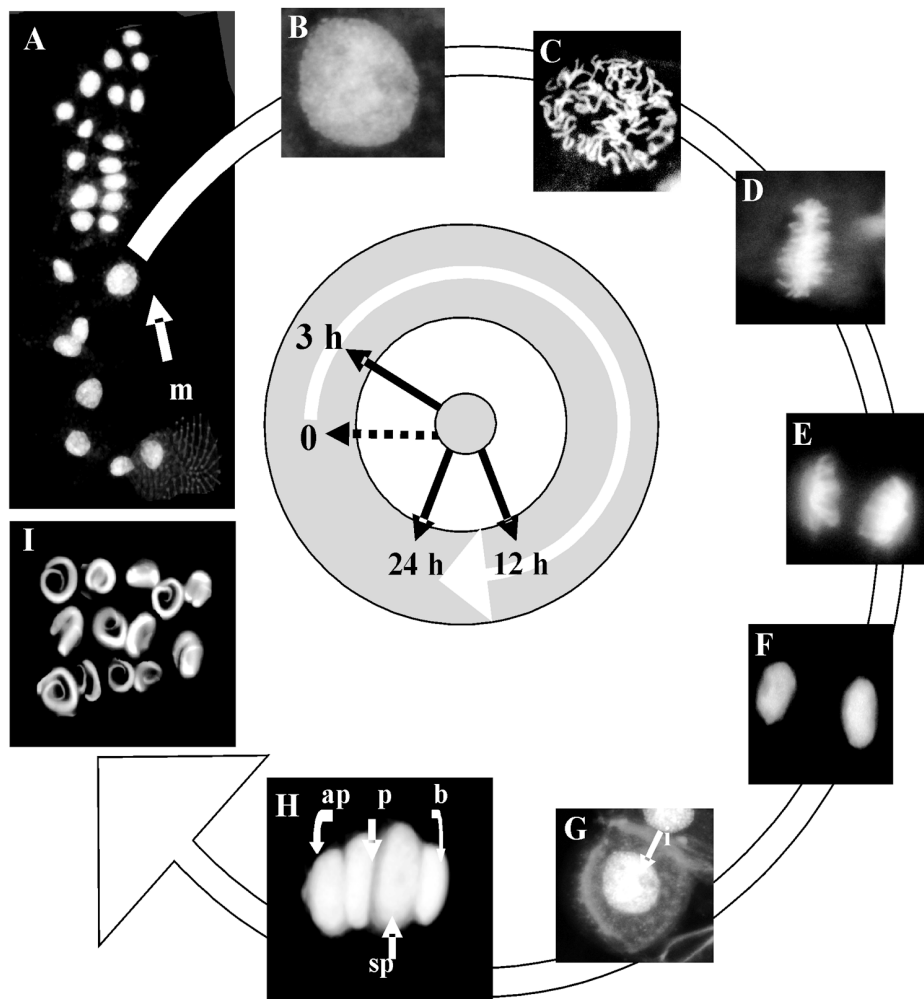
ków do komórki jajowej (ryc. 3H,I). Taki schemat tworzenia rodni występuje między innymi u *Dryopteris crassirhizoma* [12].

1.3. Powstawanie męskich organów rozrodczych – anterydiów

Męskie organy rozrodcze powstają w wyniku asymetrycznego podziału macierzystej komórki anterydium w gametofitach męskich oraz obupłciowych. Jedna komórka macierzysta może wytworzyć nawet do trzech anterydiów [26]. Proces

wewnętrznej tworzą wegetatywną ścianę archegonium (ryc. 3D). Komórka pierwotna znajdująca się w środku trzykomórkowej kolumny dzieli się asymetrycznie i poprzecznie tworząc małą macierzystą komórkę szyjkowo-kanalową (nm) i większą komórkę centralną (ck). Ta ostatnia silnie wzrasta i staje się wielokrotnie większa od macierzystej komórki szyjkowo-kanalowej (ryc. 3E-F), która w następnym etapie wydłuża się, a jej jądro dzieli się dając dwujądrową komórkę szyjkowo-kanalową (nk; ryc. 3G). Komórka centralna dzieli się poprzecznie i asymetrycznie na większą, proksymalnie ułożoną komórkę jajową (j) i dystalnie ułożoną, mniejszą komórkę kanałowo-brzuszną (vk). W czasie, kiedy komórka jajowa zwiększa swoje rozmiary, archegonium przekształca się z formy cylindrycznej w butelkowatą (ryc. 3H), natomiast komórki szyjkowo-kanalowa i kanałowo-brzuszną ulegają degeneracji, ułatwiając przemieszczanie się plemni-

indukcji anterydiów jest uzależniony od anterydiogenów wytwarzanych przez duże merystematyczne osobniki będące w tak zwanej fazie żeńskiej. Miernikiem zdolności gametofitów do wytworzenia anterydiów jest tzw. „ccn” – krytyczna liczba komórek. Wartość „ccn” oznacza liczbę komórek, przy której 50% gametofitów w populacji



RYCINA 4. Schemat rozwoju anterydium. (A) fluorescencyjny obraz gametofitu paproci *A. phyllitidis* (DAPI/UV). W wyniku działania kwasu giberelinowego zachodzi indukcja anterydiogenezy rozpoczynająca się wzrostem powierzchni profilu jąder komórek macierzystych anterydium. (B-F) kolejne fazy mitozy indukowanej kwasem giberelinowym (0 h) prowadzą do powstania (G) komórki inicjalnej anterydium i utworzenia (H) dojrzałego anterydium zbudowanego z trzech komórek tarczek i komórki spermatocyta. W wyniku podziału jądra komórki inicjalnej tworzą się: komórka dolna i górna. Dolna różnicuje w bazalną komórkę tarczek – b. Natomiast komórka górna dzieli się dając jądro spermatocyta i komórkę, która następnie dzieli się na komórkę szczytową – ap i pierścieniową tarczek – p. W wyniku kolejnych podziałów spermatocyta powstają spermatydy i w konsekwencji plemniki, których liczba nie przekracza 16–18 w anterydium (I). (C) profaza; (D) metafaza; (E) anafaza; (F) telofaza; an – anterydium, i – komórka inicjalna, m – komórka macierzysta, sp – spermatocyt, 0–24 h – przybliżone czasy kolejnych etapów rozwoju anterydium

wytwarza przynajmniej jedno anterydium [36] i wskazuje na moment osiągnięcia przez komórki fizjologicznej, płciowej dojrzałości. Wyrazem tej dojrzałości jest szereg cytomorfologicznych parametrów macierzystych komórek anterydiów [15,16].

Szczegółowa analiza przebiegu powstawania anterydiów została wykonana, także podczas indukowanej kwasem giberelinowym anterydiogenezy w gametofitach *A. phyllitidis* [15,17]. W płciowo niezdeteminowanych gametofitach (ryc. 2E; 4A) pierwsze anterydia pojawiają się po 24 h działania kwasu giberelinowego (ryc. 2F'; 4H), w wyniku podziału (ryc. 4B-F) komórek macierzystych anterydiów (ryc. 4A). W pierwszym etapie powstaje komórka inicjalna (ryc. 4G). W wyniku podziału jądra komórki inicjalnej tworzy się dolna i górna komórka. Dolna różnicuje się w komórkę bazalną tarczki (ryc. 4H-b), podczas gdy komórka górna dzieli się dając jądro spermatocyta i komórkę, która następnie dzieli się na komórkę szczytową (ryc. 4H-ap) i pierścieniową tarczki (ryc. 4H-p). W czasie proliferacyjnej fazy spermatogenezy, w wyniku serii synchronicznych podziałów spermatocyta ustala się liczba spermatyd, np. u *A. phyllitidis* na około 16–18 (ryc. 4I). Druga faza różnicowania, tzw. spermiogeneza obejmuje przede wszystkim reorganizację struktury chromatyny spermatozoidów. Jednym z jej elementów jest wymiana zasadowych białek jądrowych – histonów – na bardziej elektroforetycznie ruchliwe, bogate w arginę protaminy, tak jak to ma miejsce w przypadku spermiogenezy u *Marsilea vestita* [34]. Plemniki paproci są zaopatrzone w liczne wici oraz spiralnie zwinięte jądro. Rozwój wici pozostaje w ścisłym związku z ciałkiem podstawowym utworzonym z tubulin i centryn [41], którego powstanie jest kontrolowane przez blefaroplast. Blefaroplast jest strukturą zastępującą centrosom i powstaje przed trzema ostatnimi podziałami mitotycznymi spermatocyta z tzw. wielowarstwowej struktury, MLS [41]. Liczba wici wytwarzanych przez plemniki u paproci waha się od 40 do 200. U gatunków z rodzaju *Ceratopteris* osiąga wartość około 64, podczas gdy u różnazarodnikowej paproci *M. vestita* wynosi 140 [41]. Plemniki glonów, mszaków, porostów oraz niektórych wątrobowców wyposażone są tylko w dwie wici. Dla porównania, u niektórych roślin nagozłazkowych (cykasy, *Ginkgo biloba*) w odróżnieniu od roślin wyższych, których plemniki nie mają wici, liczba ich wynosi od 1 200 do 30 000 [46].

2. ANTERYDIOGENY JAKO ENDOGENNE CZYNNIKI INDUKCJI MĘSKIEJ PŁCI U PAPROCI

Warunkiem wzrostu gametofitów oraz rozwoju organów rozrodczych u paproci jest wydzielanie do podłoża endogennych czynników zwanych anterydiogenami [48]. Feromony te zidentyfikowano lub przypuszcza się, że istnieją u wielu gatunków paproci, w tym u paproci należących do takich rodzin, jak: *Aspidiaceae*, *Blechnaceae*, *Parkeriaceae*, *Pteridaceae* oraz *Schizaeaceae*. Wśród głównych biologicznych właściwości anterydiogenów, obok indukcji płci męskiej [26,39,48], należy wymienić hamowanie rozwoju archegoniów [28] i merystemów z równoczesnym

ograniczeniem wzrostu gametofitów [26,39] oraz indukcję kiełkowania zarodników w ciemności [50].

Stwierdzono, że anterydiogeny pochodzące z gametofitów gatunków rodziny *Schizaeaceae*, ze względu na swoją budowę chemiczną należą do dużej grupy diterpenoidowych hormonów roślinnych, giberelin [22,48]. Dotychczas poznano chemiczną strukturę 12 anterydiogenów, a kwas anterydiowy wyizolowany z gametofitów *A. phyllitidis* (A_{An}) jest pierwszym anterydiogenem scharakteryzowanym pod względem chemicznym i jednocześnie najważniejszym czynnikiem tego typu [28]. Szlak syntezy kwasu anterydiowego przebiega od GA_{103} poprzez GA_{107} do $Me-GA_{73}$, a następnie od GA_{24} do GA_{73} . Kwas anterydiowy zidentyfikowano także w gametofitach *A. rotundifolia*, *A. flexuosa* oraz *A. hirsuta*. Natomiast, główny anterydiogen produkowany przez gametofity *A. mexicana* to giberelina 104 (GA_{104}). Obok tych anterydiogenów znany jest także ester metylowy gibereliny 73 ($Me-GA_{73}$) występujący w gametofitach *Lygodium* (*L. japonicum*, *L. circinnatum*, *L. flexuosum*) oraz ester metylowy gibereliny 9 ($Me-GA_9$) obecny w *L. japonicum* i *L. circinnatum*. W gametofitach *L. circinnatum* zidentyfikowano, także inne anterydiogeny, pochodne estrów metylowych jednohydroksykwasów gibereliny 9 (GA_9) oraz gibereliny 73 (GA_{73}) [22,48].

Wiedza o strukturze chemicznej anterydiogenów izolowanych z gametofitów innych gatunków jest raczej ograniczona. Należy jednak zwrócić uwagę na anterydiogen *C. richardii* (A_{CE}), który ze względu na swą aktywność biologiczną i naturę chemiczną oraz wrażliwość na inhibitory syntezy giberelin (np. AMO-1618 i ancymidol) można z dużym prawdopodobieństwem uważać również za giberelinę [39,48].

Anterydiogeny charakteryzują się zróżnicowaną gatunkowo-specyficzną aktywnością biologiczną wykazywaną w tzw. reakcji krzyżowej. Aktywność ta przejawia się w zdolności do indukcji płci męskiej u innych gatunków [26,48]. Na tej podstawie można wyróżnić:

- I. Anterydiogeny o dużej specyficzności gatunkowej, które są aktywne biologicznie tylko w przypadku gametofitów własnego gatunku, np.: *C. richardii*, *Ceratopteris angustifolium*, *Ceratopteris thalictroides*, *L. japonicum* oraz *Onoclea sensibilis*.
- II. Anterydiogeny o podwójnej specyficzności gatunkowej, które wykazują aktywność biologiczną w stosunku do gametofitów własnego gatunku oraz do jednego innego gatunku (nazwa tego gatunku jest podana w nawiasie): *Dryopteris filix-mas* (*P. aquilinum*), *Blechnum gibbum* (*O. sensibilis*) oraz *A. phyllitidis* (*L. japonicum*). Na uwagę zasługuje fakt, że anterydiogen z *Phlebodium aureum* nie indukuje procesu anterydiogenezy w gametofitach własnego gatunku, natomiast z powodzeniem pełni tę rolę dla gametofitów *O. sensibilis* [5].
- III. Anterydiogeny *Pteridium aquilinum* (A_{Pt}) oraz *Pteris vitatta* (A_{Ps}) to polispecyficzne anterydiogeny, które indukują anterydiogenezę w gametofitach co najmniej 38 gatunków paproci [21]: *C. angustifolium*, *Ceratopteris phyllitidis*, *Lepisorus thunbergianus*, *Microgramma heterophylla*, *Phymatosorus scolopendria*, *Polypodium pellucidum*, *O. sensibilis* oraz *Phlebodium aureum*.

Aktywność anterydiogenów wykazują również niektóre tzw. autentyczne gibereliny, a spektrum ich aktywności w indukcji anterydiogenezy przedstawia następujący szereg: $GA_7 = GA_4 > GA_1 > GA_3 > GA_9 = GA_5 = GA_8$ [35], natomiast ich aktywność w hamowaniu

procesu determinacji płci żeńskiej przedstawia szereg: $GA_4 = GA_9 > GA_7 > GA_3 > GA_1 = GA_5 = GA_8$ [28]. Anterydiogenne działanie naturalnych giberelin dotychczas stwierdzono tylko u gatunków paproci z rodzajów rodziny *Schizaeaceae* (*Anemia*, *Lygodium*, *Schizaea* i *Mohria*) oraz z rodzaju *Vittaria* należących do rodziny *Vittariaceae* [48].

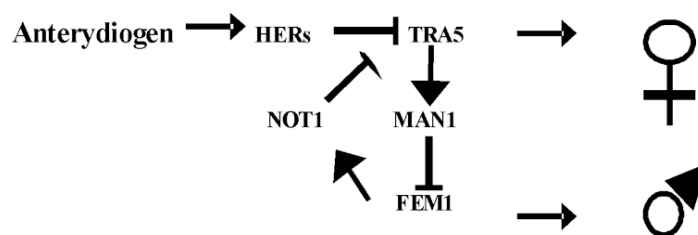
3. GENETYCZNE PODSTAWY DETERMINACJI PŁCI U PAPROCI

Rozwój płci w gametofitach paproci, takiej jak *C. richardii* (o liczbie chromosomów $1n = 37$) osiągającej płciową dojrzałość po 14 dniach od inokulacji [39], jest determinowany epigenetycznie z udziałem A_{CE} [48]. Anterydiogen indukujący płęć męską u *C. richardii* nie jest wydzielany przez osobniki obojnacze [39] dotąd, dopóki nie utracą wrażliwości na jego działanie, a utrata tej wrażliwości manifestuje się pojawieniem się merystemu. Gametofit rozwija się jako męski (pozbawiony merystemu) tylko wówczas, gdy plechy bardzo młode, pomiędzy drugim a czwartym dniem kiełkowania są ciągle ekspozowane na A_{CE} , co czyni ten efekt trwałym. Przy braku anterydiogenów efekt jest przemijający; następuje wówczas szybki wzrost plechy i obok merystemu powstają także archegonia [39,43]. Częstość występowania w populacji gametofitów obojnych w porównaniu z męskimi wzrasta wraz ze spadkiem gęstości kiełkujących zarodników w środowisku [43], co jest bezpośrednią konsekwencją spadku stężenia anterydiogenu wydzielanego do hodowanego podłoża i możliwości jego oddziaływania na inne gametofity [43].

Zrozumienie mechanizmów determinacji płci u paproci jednazarodnikowych staje się w znacznym stopniu możliwe dzięki wyodrębnieniu u *C. richardii* szeregu mutantów oraz opisaniu prawdopodobnych genów biorących udział w tym procesie [37,39]. Spośród 140 mutantów uzyskanych po zastosowaniu promieniowania X oraz kwasu etylometanosulfonowego wyselekcjonowano kilka ich fenotypowych klas:

(1) obojnacze – *her*, z merystemem i archegoniami oraz anterydiami, które są niewrażliwe na anterydiogen; (2) męskie – *tra*, tylko z anterydiami; (3) żeńskie – *fem*, z merystemem i archegoniami; (4) obojnacze – *man*, z merystemem i archegoniami oraz zwiększoną liczbą anterydiów w porównaniu z męskimi lub obojnymi gametofitami dzikiego typu; (5) męski – *not*, bez merystemu brzeżnego natomiast z centralnym merystemem [37] oraz (6) mutanty *abr* – niewrażliwe na działanie kwasu abscysynowego (ABA).

Porównawcze badania wykonane przy użyciu szeregu podwójnych mutantów (np. *fem1tra1*; interseks z anterydiami i merystemem) oraz potrójnych (*fem1not1tra1*; bezpłciowy) doprowadziły do opisu epigenetycznego mechanizmu interakcji pomiędzy genami, co pozwoliło na zaproponowanie hipotetycznego mechanizmu regulacji determinacji płci u *C. richardii* (ryc. 5). Wydaje się, że płęć u tego gatunku zależy od aktywności dwóch niezależnie działających genów, *FEM1* i *TRA1*. Gen *FEM1* kontroluje rozwój płci męskiej, podczas gdy *TRA1* kontroluje rozwój płci żeńskiej. Geny te hamują swoją aktywność poprzez wzajemne oddziaływania, i tak, kiedy *TRA1* jest aktywny, *FEM1* jest nieaktywny i na odwrót [37,39].

RYCINA 5. Schemat determinacji płci u *C. richardii*

Analizy mające na celu określenie ekspresji i aktywności specyficznych genów podczas procesu anterydiogenezy pozwoliły, jak dotychczas, tylko na identyfikację jednego genu o nazwie *ANII*, którego ekspresja uwiadcza się w pierwszych godzinach (0,5–3 h) po podaniu anterydiogenu. Ekspresja tego genu jest konstytutywna tylko w męskich mutantach *tra*. Produktem genu *ANII* jest białko (ANI1) o masie cząsteczkowej ok. 22 kDa i charakterze beta skrętnego łańcucha z sekwencją aminokwasową w 40% podobną do lipokainy. Wskazując, że białko to może mieć zdolność wiązania anterydiogenu, przez co może zwiększać stężenie albo ułatwiać wiązanie tego feromonu do właściwych receptorów [47].

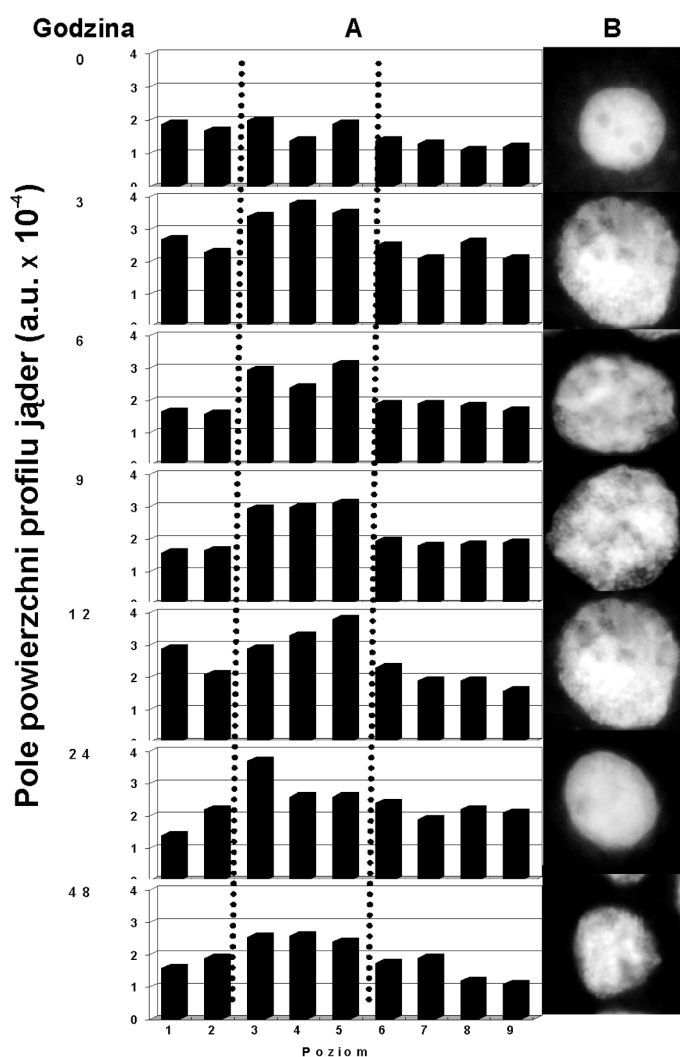
4. ROLA GA_3 I ETYLENU W DETERMINACJI PŁCI MĘSKIEJ ORAZ REGULACJI WZROSTU I ROZWOJU GAMETOFITÓW

Małe gametofity paproci *A. phyllitidis*, dzięki anterydiogennym właściwościom kwasu giberelinowego (ryc. 2F'; 4) strukturalnie podobnego do kwasu anterydiowego [26,35,36,48], są dogodnym obiektem do badań przebiegu pierwszych etapów procesu anterydiogenezy [14–18,26,35,36,48]

4.1. Trójstrefowy schemat budowy gametofitów *A. phyllitidis* jako model badawczy

Gametofity *A. phyllitidis* hodowane w warunkach kontrolnych oraz poddawane działaniu kwasu giberelinowego (GA_3) wykazują zróżnicowanie w przebiegu procesu morfogenezy: obok różnicy w wielkości gametofitów, obserwuje się także różnice w wielkości komórek, są one znacząco większe w gametofitach traktowanych GA_3 niż w gametofitach kontrolnych [14,15,26,35]. Pomiary cytomorfometryczne komórek oraz ich jąder (ryc. 6) wykonywane w młodych 12-dniowych (15-komórkowych) gametofitach *A. phyllitidis* wskazały na istnienie trzech strukturalnie i funkcjonalnie odmiennych stref, bazalnej, anterydialnej i apikalnej [15] (ryc. 7):

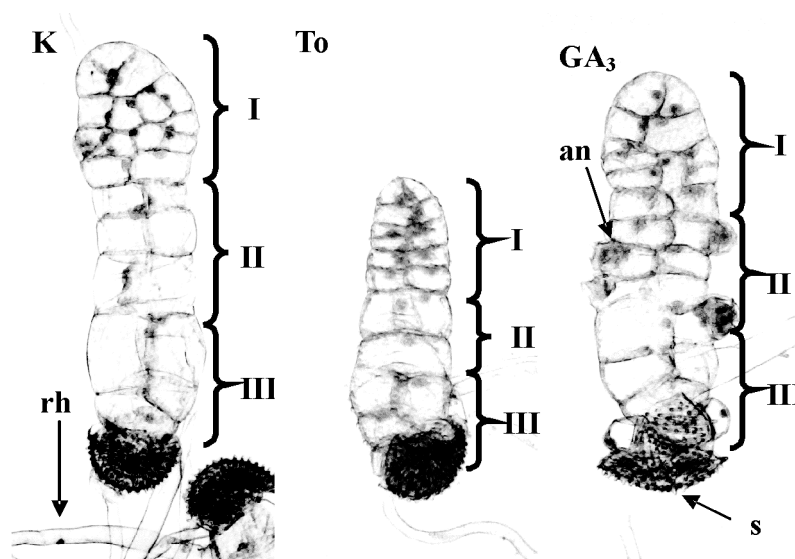
- (1) Strefa apikalna (ryc. 7) to komórki (47%) szczytowej części gametofitu, charakteryzujące się niewielkimi rozmiarami i równomiernym wzrostem oraz dość intensywnymi podziałami w stosunku do komórek pozostałej części plechy [15].
- (2) Strefa anterydialna (ryc. 7) obejmuje komórki (około 33%) środkowej części gametofitu, o zbliżonych rozmiarach, odpowiedzialne za wzrost gametofitu i podatne na indukujące działanie GA_3 inicjujące poprzeczny kierunek wzrostu komórek, któ-



RYCINA 6. Obraz zmian profilu powierzchni jąder komórkowych w gametofitach *A. phyllitidis* w trakcie anterydiogenezy indukowanej kwasem giberelinowym

re poprzedza powstanie anterydiów. Specyficzną cechą tego wzrostu jest zmiana relacji szerokości (W) do długości (L) komórek (ryc. 4A,m; ryc. 7). Iloraz tych wartości daje precyzyjny wskaźnik określający parametry wzrostu komórek macierzystych anterydiów, wynoszący około 1,6 [15]. Z tych komórek powstają komórki inicjalne (ryc. 4G), a następnie anterydia (ryc. 2F',4H).

- (3) Strefa bazalna (ryc. 7) obejmuje grupę około 20% komórek okolicy przyzarodnikowej gametofitu, które są zaangażowane w podziały prowadzące do wytwarzania ryzoidów (chwytników) i charakteryzują się zróżnicowanym wzrostem i wrażliwością na kwas giberelinowy.



RYCINA 7. Trójstrefowy schemat budowy gametofitu *A. phyllitidis*. (K) 16-dniowy i (To) 12-dniowy gametofit hodowany w warunkach kontrolnych oraz (GA₃) 12-dniowy gametofit hodowany przez kolejne cztery dni w środowisku 30 mM kwasu giberelinowego. (I) strefa apikalna, (II) strefa anterydialna, (III) strefa bazalna, an – anterydium, rh – ryzoid, s – zarodek, wg Kaźmierczak 2003a [15]

4.2. Regulacja aktywności podziałowej komórek gametofitów *A. phyllitidis*

Rozwój organizmów roślinnych jest sumą efektów wzrostowych poszczególnych komórek oraz ich aktywności podziałowej, utrzymanie której zapewnia roślinie optymalną liczbę komórek w toku jej rozwoju. Pomiary cytofotometryczne wykazały, że GA₃ indukuje w około 37% wzrost powierzchni profilu jąder komórkowych (NPA) [14]. Takie zjawisko często tłumaczone jest jako morfologiczny przejaw indukcji i kontynuacji procesów transkrypcji i/lub replikacji [23]. Stwierdzono, że zmiany NPA rozpoczynają się już w 3 h po podaniu GA₃. Największe nasilenie tego procesu obserwuje się w komórkach środkowej części gametofitu, będących macierzystymi komórkami anterydiów (ryc. 6) [15], czyli w strefie anterydialnej (ryc. 7). Analizy rozkładów zawartości C DNA wykazały, że wartość 1C DNA dla *A. phyllitidis* wyznaczona na podstawie wzorcowej zawartości C DNA dla *Pisum sativum* (2C = 10 pg) wynosi 11,4 pg [17]. Wartość ta nie różni się zasadniczo od wartości wykazanej dla paproci *C. richardii* (1C DNA = 10 pg; zob. [39] i cyt. tam lit.).

Stosując zmodyfikowaną metodę barwienia jąder komórkowych pararozaniliną [15] stwierdzono wyraźne zróżnicowanie w populacji jąder w poszczególnych fazach cyklu komórkowego zarówno w strefie anterydialnej, jak i apikalnej gametofitu. Liczba komórek w fazie G1, S i G2 cyklu komórkowego w apikalnej strefie gametofitu wynosi 75%, 17% i 8% oraz odpowiednio 45%, 30%, 25% w grupie komórek strefy anterydialnej i pozostaje niemal identyczna w kolejnych czterech dniach hodowli. Podanie kwasu giberelinowego indukuje wzrost populacji komórek w fazie S cyklu z maksimum w 9 h (60%) i 12 h (63%) [15]. Wzrost liczebności komórek w fazie

S cyklu komórkowego świadczy o indukcji podziałów mitotycznych, co wraz ze specyficzną zmianą morfologii ich jąder (wzrost NPA) oraz komórek (obejmującą indukcję poprzecznego kierunku wzrostu) prowadzi do powstania anterydiów. Podczas gdy zmiany w liczebności populacji komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego komórek strefy apikalnej, w czasie 12-godzinnego działania GA_3 , świadczą o dokonujących się tam podziałach zwiększających pulę komórek wegetatywnych gametofitu [15].

4.3. Udział etylenu w regulacji wzrostu i rozwoju oraz determinacji płci u roślin

Etylen to drugi regulator wzrostu i rozwoju roślin, który obok giberelin uznany jest za hormon płci. Odpowiada on u wielu roślin za rozwój płci żeńskiej [24,49]. Hormon ten w postaci gazowej jest produkowany przez niemal wszystkie organizmy roślinne (rośliny okrytozalążkowe, rośliny nagolężkowe, paprocie, mszaki, porosty), a także przez niektóre mikroorganizmy [2]. Kontroluje on wiele innych procesów, w tym kiełkowanie nasion, wzrost i różnicowanie komórek, kwitnienie oraz starzenie się roślin [42] i endoreplikację [7,11]. Szlak syntezy etylenu (tzw. Cyklu Yanga [2]) rozpoczyna się od przekształcenia metioniny w S-adenozylometioninę (SAM), a następnie SAM w ACC za pomocą odpowiedniej syntetazy. W końcowym etapie ACC jest utleniany przy udziale oksydazy ACC do etylenu oraz dwutlenku węgla i cyjanowodoru [42].

U większości roślin niższych, m.in. u *Pteridium aquilinum* [40] i *Funaria hygrometrica* [30], synteza etylenu odbywa się zgodnie z przytoczonym schematem, z udziałem kluczowego metabolitu, jakim jest ACC. Tylko u niektórych roślin, np. u paproci wodnych czy też pływających, synteza etylenu może odbywać się za pośrednictwem innych metabolitów pośrednich [9, 27].

4.4. Cytomorfologiczne aspekty udziału etylenu w determinacji płci u *A. phyllitidis*

Wykazano, że podanie ACC wywołuje synergiczny efekt na indukowany przez GA_3 [16] proces ekspresji płci męskiej. W ciągu czterech dni, liczba męskich organów rozrodczych ulega podwojeniu z 2,8 do 5,7 przy udziale 10 μM ACC i 30 μM GA_3 [15]. Procesowi temu towarzyszy utrzymanie wskaźnika wzrostu komórek strefy anterydialnej wyrażonego ilorazem szerokości do długości ($W/L \geq 1,6$). Działanie ACC nie wywołuje indukcji anterydiów, mimo że w wyższych stężeniach ACC, na skutek ograniczenia długości komórek, wartość W/L wynosiła 1,6. Przejawem indukcji anterydiogenezy z udziałem ACC [16] jest także dyspersja chromatyny komórek strefy anterydialnej, podobna do tej, jaką powoduje w gametofitach paproci kwas giberelinowy [14,15].

Na podstawie rozkładów populacji komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego (uzyskanych w wyniku pomiarów cytofotometrycznych) stwierdzono, że indukcja anterydiów w strefie anterydialnej z udziałem ACC, poprzedzona jest zwiększeniem z 30% (0 h) do 60% (12 h) populacji komórek w fazie S. Obserwacje te wskazują tym samym na specyficzną aktywację podziałów komórkowych związaną z anterydiogenezą indukowaną GA_3 [15].

Zastosowanie kwasu aminooksyoctowego (AOA) [42], inhibitora syntezy ACC pozwala na głębsze zrozumienie kooperacji etylenu i kwasu giberelinowego w regulacji morfogenezy oraz indywidualnych efektów wywołanych przez oba wspomniane regulatory. Stwierdzono, że AOA hamuje proces anterydiogenezy i rozwój gametofitów paproci. Główną przyczyną tego ograniczenia jest zahamowanie poprzecznej i wydłużeniowej ekspansji komórek. Wyniki te wskazują jednocześnie, że proces indukcji poprzecznego kierunku wzrostu komórek jest zależny od etylenu, podczas gdy zarówno etylen, jak i kwas giberelinowy są zaangażowane w regulację wydłużeniowej ekspansji komórek *A. phyllitidis* [17].

Gametofity paproci to haploidalne organizmy, jednakże w początkowym okresie ich rozwoju pewien procent komórek zawiera jądra o wyższej niż 2C zawartości DNA [20]. W przypadku paproci *A. phyllitidis* w gametofitach kontrolnych liczba komórek z poliploidalnymi jądrami, tj. o zawartości DNA większej niż 2C jest niska i tylko czasem osiąga wartość 3%. Podanie AOA powoduje w anterydialnej strefie gametofitów wzrost liczby komórek o zawartości DNA większej niż 2C do 6% i aż do 15% w układzie łącznego działania GA_3 i AOA. Wzrost liczby komórek poliploidalnych wskazuje, że gibereliny w postaci egzogennie podanego GA_3 lub endogennie występujących anterydiogenów promują syntezę DNA. Zahamowanie wzrostu komórek spowodowane działaniem AOA, utrudniające osiągnięcie rozmiarów odpowiednich do podziałów, powoduje zwiększenie liczby komórek o zawartości 2C DNA. Oznacza to, że tak jak etylen, tak i gibereliny współdziałają w kontroli procesu poliploidyzacji w gametofitach paproci [17] podobnie jak u roślin wyższych [11].

Potwierdzenia udziału etylenu w procesie determinacji płci oraz kontroli wzrostu i rozwoju gametofitów paproci dostarczyły także badania z dwoma innymi regulatorami syntezy etylenu, a mianowicie pierwotnego substratu etylenu (metioniny) i jonów Co^{2+} , inhibitora oksydazy ACC [2]. Obie substancje w połączeniu z GA_3 zwiększały liczbę anterydiów, natomiast zarówno w obecności, jak i przy braku GA_3 zwiększały całkowitą liczbę komórek w gametofitach. Metionina, tak jak jony kobaltu, indukowała w niektórych gametofitach wyodrębnienie się merystemu brzeżnego, jak również żeńskich organów rozrodczych (w początkowych etapach ich rozwoju, w stadium trzykomórkowym), co było konsekwencją aktywacji podziałów komórkowych [18]. Wytlumaczenie niemal identycznych efektów wywołanych przez dwa czynniki, które regulują syntezę etylenu w bardzo odległych etapach, jest możliwe tylko na podstawie istnienia tzw. sprzężenia zwrotnego [2]. Wiele efektów wywołanych przez etylen podlega procesowi, w którym obserwuje się np. indukcję syntezy ACC poprzez wzrost lub obniżenie stężenia wydzielanego etylenu [2]. Oba te czynniki najprawdopodobniej zwiększają stężenie ACC albo poprzez zwiększenie stężenia metioniny, tj. substratu dla jego syntezy, albo też poprzez ograniczenie aktywności oksydazy ACC poprzez działanie jonów kobaltu [42], co sugeruje, że nie tyle etylen, co ACC może być regulatorem omawianych procesów. Okazuje się bowiem, że ACC może w sposób niezależny od etylenu uruchamiać procesy specyficzne dla etylenu, poprzez indukcję specyficznych dla tego procesu kinaz receptorowych [8].

4.5. Zmiana struktury ściany komórkowej towarzysząca anterydiogenezie indukowanej kwasem giberelinowym

Proces determinacji płci męskiej u *A. phyllitidis* jest ściśle związany z regulacją zarówno wielkości, jak i sposobu wzrostu komórek gametofitu, czyniąc je podatnymi na działanie kwasu giberelinowego. Podstawą zmiany kierunku wzrostu komórek są modyfikacje w aranżacji włókien celulozowych [19]. Specyficzne barwienie fluorescencyjne wykonane za pomocą fluorochromu (Fluostain) ujawnia w większości komórek młodych gametofitów obecność zróżnicowanych pod względem wielkości plam celulozowych. Podanie kwasu giberelinowego indukuje w ścianach komórek strefy anterydialnej prostopadłe i skośne ułożenie fibrylli celulozowych w stosunku do poprzecznego kierunku wzrostu komórek. W komórkach gametofitów poddanych działaniu AOA obserwuje się nieregularny typ ułożenia włókien celulozowych, natomiast po podaniu łącznie AOA i GA_3 – skośny i podłużny typ aranżacji włókien ściany komórkowej [17].

5. PODSUMOWANIE

Zebrane w tej pracy wyniki potwierdzają związek kierunku wzrostu komórki z charakterem organizacji struktury ściany komórkowej [19], wyjaśniając jednocześnie mechanizmy regulacji determinacji płci, w których widoczna jest indukcja poprzecznego wzrostu komórek przy udziale etylenu i kwasu giberelinowego.

Prezentowane wyniki analiz przemawiają za istnieniem specyficznego sprzężenia tak pomiędzy endogennymi anterydiogenami i ACC, jak również między kwasem giberelinowym i ACC, a reakcja przedrośla jest wypadkową aktywności obu tych hormonów. Egzogenne dostarczenie kwasu giberelinowego zmienia program rozwojowy gametofitów oraz optymalizuje fizjologiczno-biochemiczne warunki determinacji płci. Związane z tym procesem zmiany w rozwoju gametofitu, szczególnie silnie przejawiają się w obrazie morfologicznym. Wzajemna relacja stężeń giberelin i etylenu u *A. phyllitidis* zdaje się mieć podobne znaczenie, jak w przypadku regulacji determinacji płci u ogórka (*C. sativus*), który dotychczas był jedną z nielicznych roślin wykorzystywanych w badaniach roli giberelin i etylenu w procesie determinacji płci [38,44,51]. Kooperacja pomiędzy giberelinami a etylenem w kontroli procesów rozwojowych może odbywać się za pośrednictwem białek DELLA, należących do rodziny czynników regulacji transkrypcji (GRAS), które integrują zewnętrzne i wewnętrzne sygnały komórkowe oraz działają jako regulatory wzrostu [1]. Istotnym elementem współdziałania etylenu i giberelin wydaje się być regulacja ich stężeń, przy udziale bezpośredniego prekursora etylenu, jakim jest kwas cyklopro-pylo-1-amino-1-karboksylowy (ACC). Podany egzogenne GA_3 podczas indukcji wydłużania epikotyli *Vigna angularis*, zwiększa ilość ACC poprzez stymulację aktywności syntetazy ACC i hamowanie aktywności oksydazy ACC [13,45]. Gibereliny regulują poziom etylenu [13], zaś etylen z kolei może zmieniać poziom giberelin. W przypadku *Rumex palustris*, etylen podany egzogenne powoduje wzrost zawartości giberelin

oraz zwiększenie wrażliwości na ten hormon [31]. Podobne zjawisko zaobserwowano u *Oryza sativa*, u którego wzrost poziomu endogennego etylenu, w wyniku okresowego zalania, zwiększa stężenie giberelin, powodując intensyfikację wydłużania międzywęzła [45]. Z kolei promienisty wzrost korzeni cytrusów jest możliwy dzięki obniżeniu zawartości giberelin [38].

Wyniki badań uzyskane przy zastosowaniu regulatorów syntezy etylenu silnie przemawiają za istnieniem u *A. phyllitidis* szlaku syntezy alkeny podobnego do tego, jaki występuje u roślin wyższych. Wykorzystanie w badaniach anterydiogenezy kwasu aminooksyoctowego (AOA), będącego specyficznym inhibitorem aktywności syntazy ACC, pozwoliło na rozróżnienie efektów wywoływanych przez ten hormon. Z całą pewnością można stwierdzić, że gibereliny w postaci anterydiogenów lub podanego egzogennie kwasu giberelinowego, indukują syntezę DNA i podziały komórkowe. Natomiast etylen, współdziałając z giberelinami poprzez kontrolę stopnia i charakteru usieczowania ściany komórkowej i kierunku syntezy mikrofibrilli celulozowych, reguluje poprzeczny kierunek ekspansji komórek.

Zastosowanie ACC w badaniach nad udziałem etylenu w procesie determinacji płci męskiej oraz regulacji wzrostu płciowo niezdeteminowanych gametofitów paproci uzasadnia szereg faktów:

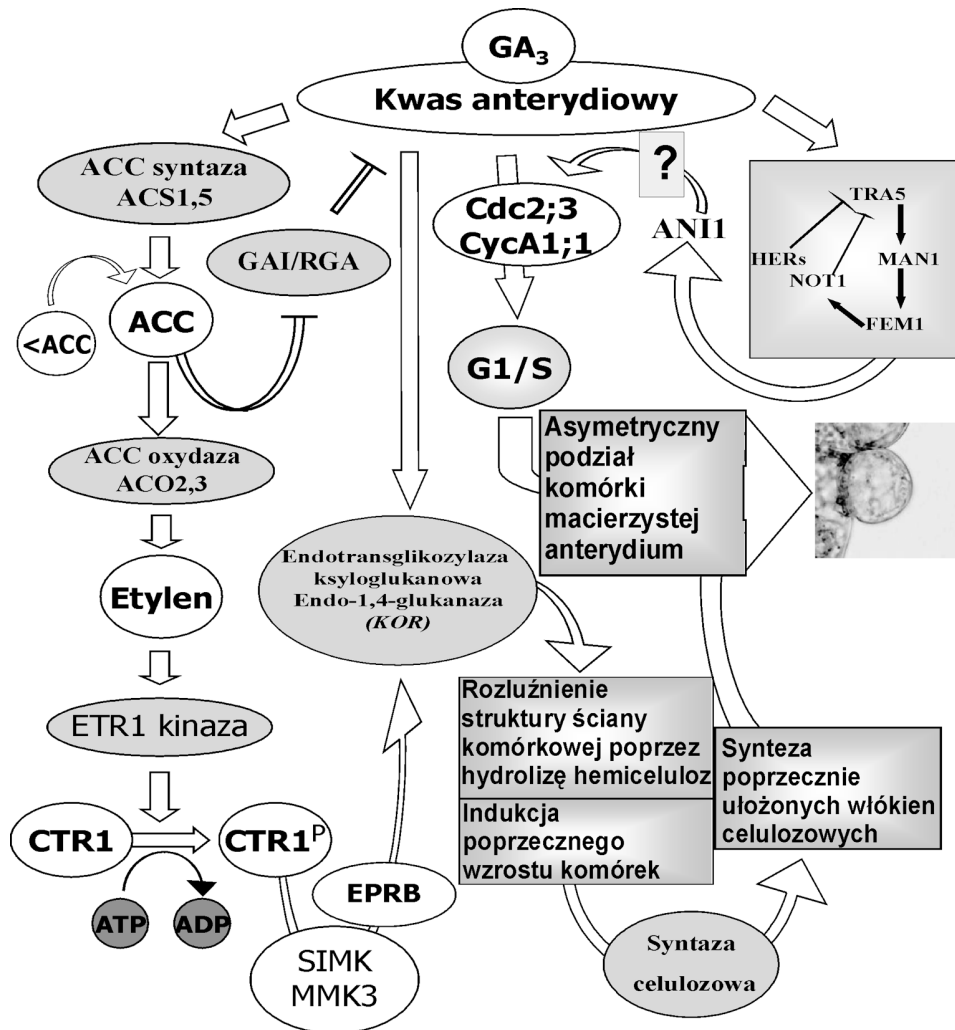
- (1) szybkość syntezy etylenu wyznacza etap syntezy ACC, który jest bezpośrednim prekursorem etylenu [4,42];
- (2) ACC bierze udział w tzw. dodatnim sprzężeniu zwrotnym: zwiększanie stężenia etylenu zwiększa aktywność oksydazy ACC [33];
- (3) ACC jest także kluczowym metabolitem we wzajemnych relacjach giberelin i etylenu w przekazywaniu sygnałów i kontroli procesów rozwojowych [1];
- (4) etylen wywołuje specyficzne, charakterystyczne efekty zwane potrójną reakcją TRS („triple response”), która obejmuje między innymi zahamowanie wzrostu wydłużeniowego łodygi i korzeni oraz indukcję grubienia hypokotyli, poprzez stymulację radialnego i poprzecznego kierunku wzrostu komórek [2,6,13,31].

Zestawienie danych literaturowych z badaniami własnymi pozwala na zaproponowanie potencjalnego mechanizmu kontroli anterydiogenezy z udziałem giberelin i etylenu, tak w okresie poprzedzającym, jak i w czasie tworzenia anterydiów.

Proces regulacji mógłby przebiegać dwutorowo (ryc. 8). Pierwsza droga polegałaby na bezpośrednim udziale kwasu giberelinowego w uruchamianiu zmian poprzedzających indukcję cyklu komórkowego, który zapoczątkowuje androgenny kierunek rozwoju gametofitów paproci. Druga przebiegałaby natomiast poprzez aktywację, za pośrednictwem ACC, mechanizmu uruchamiającego asymetryczny wzrost komórek macierzystych, prowadzący do nierównocennego ich podziału i utworzenia inicjalnej komórki i dojrzałego anterydium. Taki podział byłby konsekwencją osiągnięcia przez komórkę właściwego rozmiaru, który może być scharakteryzowany w postaci ilorazu szerokości (W) do długości (L) komórek (W/L), przy czym wartość tego ilorazu nie może być mniejsza niż 1,6.

5.1. Hipotetyczny mechanizm regulacji procesu anterydiogenezy u *A. phyllitidis*

Kwas giberelinowy pośrednio, za pośrednictwem genów determinacji płci (*TRA5*, *HER*, *MAN1*, *NOT1*, *FEMI*) i białek typu ANI1, uruchamia syntezę cyklin i



RYCINA 8. Potencjalny mechanizm regulacji morfogenezy i determinacji płci w gametofitach paproci *A. phyllitidis*

kinaz białkowych (Cdc2;3 i CycA1), w wyniku czego następuje indukcja podziałów komórkowych strefy anterydialnej gametofitów rozpoczynających rozwój anterydiów. Równocześnie z podaniem kwasu giberelinowego następuje aktywacja syntazy (ACS1,5) i oksydazy ACC (ACO2,3) prowadząca do wzrostu poziomu najpierw ACC, a następnie etylenu, który aktywuje histydynowe kinazy receptorowe (ETR1). Poprzez fosforylację kinazy CTR1 (kinazy MAP), zwalnia się w odpowiedzi na etylen tzw. negatywny mechanizm regulacji. Kolejne kinazy SIMK i MMK3 uruchamiają proces ekspresji genów, m.in. endotransglikozylazy ksyloglukanowej (XET) i endo-1,4-glukanazy (KOR), powodujących rozluźnienie struktury ściany komórkowej i syntezę nowych włókien celulozowych, które determinują poprzeczny kierunek

wzrostu komórek macierzystych anterydiów. Wzmocnienie wspomnianych efektów może nastąpić w wyniku aktywacji czynników transkrypcji zależnych od giberelin (np. GA-MYB). Właściwa koordynacja tych procesów w końcowym etapie prowadzi do asymetrycznego podziału komórek i powstania anterydiów (ryc. 8).

LITERATURA

- [1] ACHARD P, VRIEZEN WH, VAN DER STRAETEN D, HARBERD NP. Ethylene regulates *Arabidopsis* development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. *Plant Cell* 2003; **15**: 2816–2825.
- [2] BLEECKER AB, KENDE H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu Rev Cell Dev* 2000; **16**: 1–18.
- [3] CHARLESWORTH D. Plant sex determination and sex chromosomes. *Heredity* 2002; **88**: 94–101.
- [4] CHILD RD, CHAUVAUX N, JOHN K, ULVSKOV P, VAN ONCKELEN HA. Ethylene biosynthesis in oilseed rape pods in relation to pod shatter. *J Exp Bot* 1998; **49**: 829–838.
- [5] CHIOU WL, FARRAR R. Antheridiogen production and response in *Polypodiaceae* species. *Am J Bot* 1997; **84**: 633–640.
- [6] CHOW B, MCCOURT P. Hormone signalling from a developmental context. *J Exp Bot* 2004; **55**: 247–251.
- [7] DAN H, IMASEKI H, WASTENEYS GO, KAZAMA H. Ethylene stimulates endoreduplication but inhibits cytokinesis in cucumber hypocotyl epidermis. *Plant Physiol* 2003; **133**: 1726–1731.
- [8] FLEET CM, SUN T. A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 77–85.
- [9] FLUHR R. Ethylene perception: from two-component signal transducers to gene induction. *Trend Plant Sci* 1998; **3**: 141–146.
- [10] FRASER JA, HETMAN J. Chromosomal sex-determining regions in animals, plants and fungi. *Curr Opin Genet Dev* 2005; **15**: 1645–651.
- [11] GENDREAU E, ORBOVIC V, HÖFTE H, TRAAS J. Gibberellin and ethylene control endoreduplication levels in the *Arabidopsis thaliana* hypocotyl. *Planta* 1999; **209**: 513–516.
- [12] HE Q, YOU RL, SODMERGEN, BAO WM. Preprophase band loses its function as a cytokinetic apparatus in mitosis of neck canal mother cell. *Protoplasma* 2002; **220**: 105–109.
- [13] KANETA T, KAKIMOTO T, SHIBOAKA H. Gibberellin A₃ causes a decrease in the accumulation of mRNA for ACC oxidase and in the activity of the enzyme in azuki bean (*Vigna angularis*) epicotyl. *Plant Cell Physiol* 1997; **38**: 1135–1141.
- [14] KAŻMIERCZAK A. Studies on morphology and metabolism of prothalli during GA₃-induced formation of antheridia in *Anemia phyllitidis*. *Acta Physiol Plant* 1998; **20**: 277–283.
- [15] KAŻMIERCZAK A. Induction of cell division and cell expansion at the beginning of GA-induced precocious antheridia formation in *Anemia phyllitidis* gametophytes. *Plant Sci* 2003a; **165**: 933–939.
- [16] KAŻMIERCZAK A. The ethylene is a positive regulator for GA₃-induced male sex in *Anemia phyllitidis* gametophytes. *Plant Cell Rep* 2003b; **22**: 295–302.
- [17] KAŻMIERCZAK A. Aminooxyacetic acid inhibits antheridiogenesis and development of *Anemia phyllitidis* gametophytes. *Plant Cell Rep* 2004; **23**: 203–210.
- [18] KAŻMIERCZAK A. Methionine and cobalt ions control of development of fern gametophytes. *Acta Physiol Plant* 2005; **27**: 447–454.
- [19] KENDE H, ZEEVAART JAD. The five “Classical” plant hormones. *Plant Cell* 1997; **9**: 1197–1210.
- [20] KONDOROSI E, ROUDIER F, GENDREAU E. Plant cell-size control: growing by ploidy. *Curr Opin Plant Biol* 2000; **3**: 488–492.
- [21] LEBEL-HARDENACK S, GRANT SR. Genetics of sex determination in flowering plants. *Trends Plant Sci* 1997; **2**: 130–136.
- [22] MANDER LN. Twenty years of gibberellin research. *Natl Prod Rep* 2003; **20**: 49–69.
- [23] MARSHALL WF. Order and disorder in the nucleus. *Curr Biol* 2002; **12**: R185–R192.
- [24] METZGER JM. Hormones and reproductive development. W: Davis PJ [red.] *Plant Hormones*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. 1995: 617–648.
- [25] MOWSZOWICZ J. Gromada: *Pteridophyta* – Paprotniki. W: Surzycka A [red.] *Zarys systematyki roślin*. PWN, Warszawa 1983; 119–143.
- [26] NÄF U, NAKANISHI K, ENDO M. On the physiology and chemistry of fern antheridiogens. *Bot Review* 1975; **41**: 315–359.

- [27] OSBORNE DJ, WALTERS J, MILBORROW BV, NORVILLE AN, STANGE LMC. Evidence for a non-ACC ethylene biosynthesis pathway in lower plants. *Phytochemistry* 1996; **42**: 51–60.
- [28] RAGHAVAN V. Control differentiation of sex organs on gametophytes. W: *Developmental Biology of Fern Gametophytes*. Cambridge University Press, Cambridge, England. 1989: 199–219.
- [29] ROGALSKA S, MAŁUSZYŃSKA J, OLSZEWSKA MJ. Mejoza. W: Olszewska MJ [red.] *Podstawy cytogenetyki roślin*. PWN, Warszawa 1999: 105–125.
- [30] ROHWER F, BOPP M. Ethylene synthesis in moss protonema. *J Plant Physiol* 1984; **117**: 331–338.
- [31] RIJNDERS JGHM, YANG YY, KAMIYA Y, TAKAHASHI N, BARENDSE GWM, BLOOM CWPM, VOESENEK LACJ. Ethylene enhances gibberellin levels and petiole sensitivity in flooding-tolerant *Rumex palustris* but not in flooding-intolerant *R. acetosa*. *Planta* 1997; **203**: 20–25.
- [32] RUTTER MR, RAGHAVAN V. DNA synthesis and cell division during spore germination in *Lygodium japonicum*. *Ann Bot* 1978; **42**: 957–965.
- [33] PETRUZZELLI L, CORAGGIO I, LEUBNER-METZGER G. Ethylene promotes ethylene biosynthesis during pea seed germination by positive feedback regulation of 1-aminocyclo-propane-1-carboxylic acid oxidase. *Planta* 2000; **211**: 144–149.
- [34] REYNOLDS WF, WOLFE SL. Protamines in plant sperm. *Exp Cell Res* 1984; **152**: 443–448.
- [35] SCHRAUDOLF H. Relative activity of the gibberellins in the antheridium induction in *Anemia phyllitidis*. *Nature* 1964; **201**: 98–99.
- [36] SCHRAUDOLF H. Die Wirkung von Phytohormonen auf Keimung und Entwicklung von Farnprothallien II. Analyse der Wechselbeziehung und physiologischem Alter der Prothalliumzellen in *Anemia phyllitidis*. *Planta (Berl.)* 1966; **68**: 335–352.
- [37] STRAIN E, HASS B, BANKS JA. Characterization of mutations that feminize gametophytes of the fern *Ceratopteris*. *Genetics* 2001; **159**: 1271–1281.
- [38] TADEO FR, GÓMEZ-CADENAS A, BEN-CHEIKH W, PRIMO-MILLO E, TALÓN M. Gibberellin-ethylene interaction controls radial expansion in citrus roots. *Planta* 1997; **202**: 370–378.
- [39] TANURDZIC M, BANKS JA. Sex-determining mechanisms in land plants. *Plant Cell* 2004; **16**: S61–S71.
- [40] TITTLE FL. Auxin-stimulated ethylene production in fern gametophytes and sporophytes. *Physiol Plant* 1987; **70**: 499–502.
- [41] TSAI CW, WOLNIAK SM. Cell cycle arrest allows centrin translation but not basal body formation during spermiogenesis in *Marsilea*. *J Cell Sci* 2001; **114**: 4265–4272.
- [42] WANG KLC, LI H, ECKER JR. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* 2002; S131–S151.
- [43] WARNE TR, LLOYD RM. Gametophytic density and sex expression in *Ceratopteris*. *Can J Bot* 1986; **65**: 362–365.
- [44] VOESENEK LACJ, BENSCHOP JJ, BOU J, COX MCH, GROENEVELD HW, MILLENAAR FF, VREBURG RAM, PEETERS AJM. Interactions between plant hormones regulate submergence-induced shoot elongation in the flooding-tolerant dicot *Rumex palustris*. *Ann Bot* 2003; **91**: 205–211.
- [45] VAN DER KNAAP E, KIM JH, KENDE H. A novel gibberellin-induced gene from rice and its potential regulatory role in stem growth. *Plant Physiol* 2000; **122**: 695–704.
- [46] WOLNIAK SM, KLINK VP, HART PE, TSAI CW. Control of development in the spermatozooids of lower plants. *Grav Space Biol Bull* 2000; **13**: 85–93.
- [47] WEN CK, SMITH R, BANKS JA. ANI1: a sex pheromone-induced gene in *Ceratopteris* gametophytes and its possible role in sex determination. *Plant Cell* 1999; **11**: 1307–1317.
- [48] YAMANE H. Ferns antheridiogens. *Int Rev Cytol* 1998; **184**: 1–31.
- [49] YAMASAKI S, FUJII N, TAKAHASHI H. The ethylene-regulated expression of *CS-ETR2* and *CS-ERS* genes in cucumber plants and their possible involvement with sex expression in flowers. *Plant Cell Physiol* 2000; **41**: 608–616.
- [50] YAMAUCHI T, OYAMA N, YAMANE N, MUROFUSHI N, SCHRAUDOLF H, POUR M, SETO H, MANDER LN. Biosynthesis of GA₃ methyl ester in *Lygodium* Ferns. *Plant Physiol* 1997; **113**: 773–778.
- [51] YIN T, QUINN A. Tests of a mechanistic model of one hormone regulating both sexes in *Cucumis sativus* (*Cucurbitaceae*). *Am J Bot* 1995; **82**: 1537–1546.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 28.09. 2006 r.

Przyjęto: 07.11. 2006 r.

Łódź 90-231, ul. Piłarskiego 14

e-mail: kazand@biol.uni.lodz.pl