



Embriogeneza mikrospor – zmiana rozwoju gametofitowego na sporofitowy wywołana stresem

Teresa Cegielska-Taras

Pracownia Kultur Tkankowych, Zakład Roślin Oleistych,
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Poznań

Microspore embryogenesis – the stress induced change of gametophytic into sporophytic development

Summary

Microspores cultured *in vitro* can be reprogrammed to divide and produce a bipolar embryo. The reaction to stress treatment is a signal for inducing the sporophytic pathway, preventing the development of fertile pollen grain – the gametophytic pathway. The ultimate goal is to convert each microspore from a heterozygous F_1 plant to a doubled haploid plant so that a population of doubled haploids fully represents the genetic variability of the preceding meiosis.

Key words:

androgenesis, cell cycle, doubled haploid, microspore, pollen, stress.

1. Wstęp

Zjawisko embriogenezy mikrospor *in vitro* dotyczy zmiany kierunku z normalnego rozwoju gametofitowego na drogę tworzenia zarodka. Ten proces może być rozpatrywany zarówno jako przykład możliwości zmiany kierunku rozwoju komórki lub jako model do badań nad wczesnymi etapami embriogenezy roślin.

Cykl życiowy roślin składa się z fazy sporofitowej i gametofitowej. Faza sporofitowa u roślin dwuliściennych obejmuje większą część cyklu życiowego, w przeciwieństwie do fazy gametofitowej, która jest krótka i trwa zaledwie od mejozy do syngamii.

Adres do korespondencji

Teresa Cegielska-Taras,
Pracownia Kultur
Tkankowych,
Zakład Roślin Oleistych,
Instytut Hodowli
i Aklimatyzacji Roślin,
ul. Strzeszyńska 36,
60-479 Poznań;
e-mail:
tceg@nico.ihar.poznan.pl

biotechnologia

2 (65) 12–16 2004

W cyklu życiowym roślin sporofitowa tkanka pylnika – archespor – tworzy większą liczbę komórek macierzystych pyłku ($2n$), z których przez podziały mejotyczne z jednej komórki powstają cztery haploidalne mikrospory (n). Po pierwszej mitozie mikrospory rozwijają się w ziarna pyłku, zawierające jedną komórkę wegetatywną i jedną generatywną. U roślin okrytozalążkowych mikrospora jest produktem podziału redukcyjnego komórki macierzystej pyłku w pylniku i jest podstawową jednostką, z której rozwija się gametofit męski. Mikrospora rozwija się w gametę, bo tak jest zaprogramowana, ale część z nich (mikrospor) może przekształcać się w struktury zarodkowe. Rośliny rozwijające się z mikrospor posiadają haploidalną liczbę chromosomów. Po podwojeniu liczby chromosomów uzyskuje się homozygotyczny, podwojony haploid (ang. *doubled haploid*, DH) już w pierwszym pokoleniu. Z praktycznego punktu widzenia w wyniku anadrogenezy powstające rośliny, czyli podwojone haploidy, ułatwiają szybką produkcję homozygotycznych linii i selekcję roślin o pożądanym cechach recesywnych, przez co stają się częścią programów hodowlanych różnych roślin.

2. Od kultury pylników do izolowanych mikrospor

Prowadzona kultura *in vitro* pylników w stadium mikrospor w celu prześledzenia rozwoju pyłku ujawniła, że zamiast dojrzałych ziaren pyłku otrzymano zarodki posiadające gametyczną (haploidalną) liczbę chromosomów (1). Zarodki te rozwijały się w rośliny, które po diploidyzacji spontanicznej lub indukowanej dawały początek homozygotycznym, podwojonym haploidom.

Przez wiele lat kultura pylników pozostawała wybraną techniką do produkcji podwojonych haploidów. Wkrótce jednak rozpoznano, że kultura mikrospor będzie pozwalała na analizowanie embriogenezy mikrospor oraz będzie jedną z metod spełniającą oczekiwania genetyków i hodowców co do produkcji dużych populacji podwojonych haploidów z wybranych mieszańców, reprezentujących genetyczną zmienność męskiej mejozy (2).

Przełomem w badaniach było rozpoznanie, że jeden czynnik – stres – jest niezbędny do zainicjowania embriogenezy w mikrosporach lub młodych ziarnach pyłku. Zmianę z gametofitowej na sporofitową drogę rozwoju indukowano w mikrosporach przez stosowanie wielu czynników zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Na formowanie się zarodków w kulturach pylników miały m.in. wpływ warunki wzrostu roślin-dawców: głód azotowy i krótki dzień połączony z niską temperaturą, a także traktowanie odciętych kwiatostanów, pąków kwiatowych i pylników niską czy wysoką temperaturą lub substancjami chemicznymi (3). Istotnymi okazały się przeprowadzone badania, w których izolowane mikrospory, z roślin normalnie rozwijających się, poddawano działaniu stresu *in vitro*, np. głodu u tytoniu (4), czy szoku wysokiej temperatury u rzepaku (5). W tych badaniach dokładnie wykazano, że stres jakiego trzeba poddać mikrospory jest niezbędny w uzyskaniu zadowalającej wydajności embriogenezy mikrospor.

Przez czterdzieści lat badania nad androgenezą *in vitro* z powodzeniem prowadzono u wielu gatunków. Spis roślin, u których inicjowano sprofitowy wzrost mikrospor obejmują liczne opracowania, np. Ferrie i in. (6), Sopory i Munshi (7), Raghwan (8). Częstotliwość indukcji embriogenezy mikrospor u takich gatunków jak: *Brassica napus*, *Hordeum vulgare*, *Nicotiana tabacum*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum* jest na tyle wysoka, że pozwala na przeprowadzanie badań biochemicznych i molekularnych tego procesu.

3. Kultura mikrospor rzepaku

Rośliny haploidalne *Brassica napus*, drogą kultury pylników, po raz pierwszy uzyskali Thompson i Wenzel w 1975 r. (9). Zastosowanie szoku termicznego w początkowym okresie prowadzenia kultury pylników, jak wykazali Keller i Armstrong (10), polepszyło wydajność androgenazy *in vitro* u tej rośliny. Znaczne zwiększenie wydajności embriogenezy mikrospor rzepaku nastąpiło jednak dopiero po zastosowaniu kultury izolowanych mikrospor. Po raz pierwszy opis techniki izolacji mikrospor rzepaku i procesu androgenazy w kulturze izolowanych mikrospor przedstawił Lichter (11). W późniejszych pracach metodycznych spotykano różne modyfikacje mające na celu podniesienie wydajności embriogenezy mikrospor oraz skuteczną konwersję zarodków mikrosporowych (12).

Pomimo wielu lat pracy różnych ośrodków badawczych nad wyjaśnieniem procesu androgenazy *Brassica napus* zrozumienie tego zjawiska jest nadal jedynie fragmentaryczne. Pechan i Smykal (13) w swoim opracowaniu podsumowują stan badań nad indukcją androgenazy u rzepaku:

1. Konieczność działania stresu w inicjacji androgenazy. Powiązane to jest z pojawianiem się transkryptów białek szoku wysokiej temperatury (smHSP) w komórkach poddawanych stresowi. Androgenaza nie może być zainicjowana bez wywołania reakcji na warunki stresowe w postaci wystąpienia transkryptów smHSP.

2. Dziedziczne zdolności roślin do androgenazy wyrażające się reakcją na stres mikrospor.

3. Ściśle określone stadium rozwoju mikrospory, w którym indukcja do androgenazy jest możliwa. Faza pierwszej mitozy ziarna pyłku jest optymalnym momentem do zainicjowania zmiany kierunku rozwoju z gametofitowego na sporofitowy.

4. Udział jądra wegetatywnego w formowaniu się zarodka androgenicznego.

5. Zazwyczaj symetryczny pierwszy podział mikrospory rozpoczynający androgenezę.

4. Geny związane ze zmianą rozwoju mikrospory

Zdolności komórek do odpowiedzi na stres są prawdopodobnie najważniejszym czynnikiem określającym, czy androgenaza zostanie zainicjowana.

W przedstawionych przez wielu autorów wynikach badań biochemicznych i analiz molekularnych próbuje się wyjaśnić mechanizm indukcji embriogenezy mikrospor (3,14). W embriogennych mikrosporach ma miejsce powstawanie białek szoku wysokiej temperatury, fosforylacja białek oraz reinicjacja replikacji DNA (4,14,15). Wyzolowano kilka genów, których funkcja wydawała się niezbędna w embriogennych mikrosporach tytoniu, pszenicy czy rzepaku (16-18). Jednakże do dzisiaj nie wyizolowano, ani białek, ani genów induktorów androgenyzy lub specyficznych markerów dla embriogennych mikrospor (19).

5. Podsumowanie

Mikrospora w kulturze *in vitro* może być reprogramowana do podziałów i uformowania dwubiegunowego zarodka. Reakcja na stres jest sygnałem do indukcji fazy sporofitowej, zapobiegając rozwojowi płodnego ziarna pyłku-gametofitowej fazy. Ostatecznym celem tego procesu jest rozwój każdej mikrospory heterozygotycznej rośliny F₁ mieszańca w podwojonego haploida w taki sposób, aby uzyskana populacja podwojonych haploidów całkowicie reprezentowała genetyczną zmienność poprzedzającej mejozy.

W przyszłości wiedza o identyfikacji produktów genów związanych z embriogenezą mikrospor ułatwi opracowanie optymalnych warunków uzyskiwania podwojonych haploidów różnych gatunków roślin.

Literatura

1. Guha S., Maheshwari S. C., (1964), *Nature*, 204, 497.
2. Reinert J., Bajaj Y. P. S., Heberle-Bors E., (1975), *Protoplasma*, 84, 191-196.
3. Touraev A., Vicente O., Heberle-Bors E., (1997), *Trends Plant Sci.*, 2, 285-303.
4. Kayo M., Harada H., (1986), *Planta*, 168, 427-432.
5. Custers J. M. B., Cordewener J. H. G., Nöllen Y., Dons H. J. M., van Lookeren Campagne M. M., (1994), *Plant Cell Rep.*, 13, 267-271.
6. Ferrie A. M. R., Palmer C. E., Keller W. A., (1995), in: *In vitro embryogenesis in plant*, Ed. Thrope T. A., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 309-344.
7. Sopory S. K., Munshi M., (1996), w: *In vitro Haploid Production in Higher Plants*, Eds. Jain S. M., Sopory S. K., Veilleux R. E., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1, 145-176.
8. Raghwan V., (1997), *Molecular Embryology of Flowering Plants*, Cambridge University Press, Cambridge.
9. Thompson E., Wenzel G., (1975), *Z. Pflanzenzücht*, 74, 77-81.
10. Keller W. A., Armstrong K. C., (1978), *Z. Pflanzenzücht*, 80, 100-108.
11. Lichter R., (1982), *Z. Pflanzenphysiol.*, 105, 427-434.
12. Cegielska-Taras T., (2002), *Monografie i Rozprawy Naukowe IHAR Radzików*, 18, 7-107.
13. Pechan P. M., Smykal P., (2001), *Physiologia Plantarum*, 111, 1-8.
14. Cordewener J. G. H., Custers J. B., Dons H. J. M., van Lookeren Campagne M. M., (1995), in: *In vitro haploid production in higher plants*, Eds. Jain S. M., Sopory S. K., Veilleux R. E., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 107-122.
15. Zarsky V., Garrido D., Eller N., Tupy J., Vincente O., Schöffl F., Heberle-Bors E., (1995), *Plant Cell Environ.*, 18, 139-142.

16. Boutilier K. A., Gines M. J., Demoor J. M., Huang B., Baszczyński C. L., Iyer V. N., Miki B. L., (1994), *Plant Mol. Biol.*, 26, 1711-1723.
17. Reynolds T. L., Crawford R. C., (1996), *Plant Mol. Biol.*, 32, 823-829.
18. Garrido D., Eller N., Heberle-Bors E., Vincente O., (1993), *Sex. Plant Reprod.*, 6, 40-45.
19. Tashpulatov A., Indrianto A., Barinova I., Katholnigg H., Akimcheva S., Heberle-Bors E., Touraev A., (2002), in: *Plant Biotechnology 2002 and Beyond*, Proceedings of 10th IAPTC&B Congress, Ed. Indra K. Vasil, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 529-535.