

Rozmnażanie generatywne *Biscutella laevigata* L. z hałd galmanowych

Monika KWIATKOWSKA^{1*}, Karolina KŁOSOWSKA²

^{1,2}Zakład Cytologii i Embriologii Roślin, Instytut Botaniki, Wydział Biologii, Uniwersytet Jagielloński,
ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków

Wprowadzenie

W rozwoju osobniczym (ontogenezie) roślin okrytozalążkowych, do których należy *Biscutella laevigata*, występuje przemiana pokoleń czyli następowanie po sobie kolejno pokolenia diploidalnego – sporofitu i pokolenia haploidalnego – gametofitu. Sporofitem jest roślina ulistniona, która odpowiada za funkcje vegetatywne czyli wzrost, odżywianie (przeprowadza fotosyntezę), pobieranie wody i soli mineralnych ze środowiska itp., a w fazie generatywnej za wytwarzanie kwiatów. Kwiaty są bezpośrednio związane z rozmnażaniem generatywnym (płciowym). Części płonne kwiatu, działki kielicha i płatki korony tworzące okwiat, odpowiadają za wabienie zapylaczy zapachem i barwą. Sukces rozrodczy roślin owadopylnych, do których należy badany gatunek, zależy od częstotliwości odwiedzających zapylaczy przenoszących pyłek. Części odpowiedzialne za rozmnażanie płciowe, czyli struktury generatywne, to pręciki (męski organ) i słupki (żeński organ). Pręcik zbudowany jest z nitki (mogą też być pręciki beznitkowe) oraz z główki składającej się z dwóch pylników (każdy z dwóch komór pyłkowych) połączonych łącznikiem. Słupek posiada część bazalną (załążnię z załążkami) oraz szyjkę zakończoną znamieniem, na którym kielkują

– wytwarzają łagiewki pyłkowe – ziarna pyłku. Większość roślin okrytonasiennych (około 72%) rozwija kwiaty obupłciowe (tzw. kwiaty doskonałe) – w jednym kwiecie znajdują się słupki i pręciki. W kwiatach jedнопłciowych rozwijają się wyłącznie słupki (kwiat żeński) lub pręciki (kwiat męski). W rozwoju osobniczym rośliny (ontogenezie), komórki płciowe tworzą się wewnątrz słupków i pręcików. Zatem w otoczeniu somatycznych tkanek rośliny macierzystej powstają gametofity: męski (w pylnikach pręcików) i żeński (w załążkach w załążni słupka) oraz gamety (komórki plemnikowe, komórki jajowe). Zapłodnienie poprzedzone jest zapyleniem, ziarna pyłku kielkują na znamieniu słupka, łagiewka pyłkowa pokonuje drogę przez szyjkę słupka do załążni i wprowadza dwie komórki plemnikowe przez mikropyle (okienko) do wnętrza załążka. Zachodzi podwójne zapłodnienie, w wyniku którego rozwija się zarodek¹ z zapłodnionej komórki jajowej i bielmo² z zapłodnionej komórki centralnej gametofitu żeńskiego,

¹ Zarodek – początek sporofitu (2n), powstaje po zapłodnieniu czyli po fuzji komórki plemnikowej i komórki jajowej, w wyniku procesu zwanego embriogenezą. Równocześnie z rozwojem zarodka tworzy się bielmo i łupina nasienna.

² Bielmo – tkanka odżywcza dla zarodka (3n), powstaje po zapłodnieniu, czyli po fuzji komórki centralnej gametofitu żeńskiego (2n) i komórki plemnikowej (n).

* Autor korespondujący

załążki przekształcają się w nasiona, tkanki załączni w owoce, chroniące i rozsiewające nasiona. Cały cykl rozwojowy przedstawia Rycina 1. W kwiatach zatem rozwija się haploidalna faza gametofitowa w cyklu życiowym roślin okrytozalążkowych, w której haploidalne gametofity nie są zdolne do samodzielnego życia, są związane z organizmem macierzystym, korzystają z jego zasobów i są od niego całkowicie zależne. Wytworzenie gametofitów poprzedza podział redukcyjny (mejoza³) komórek macierzystych mikrospor⁴ i megaspor⁵, w czasie którego dochodzi do rekombinacji (wymiany materiału genetycznego, *crossing over*), co prowadzi do zwiększenia różnorodności genetycznej następnego pokolenia. Ma to szczególnie istotne znaczenie dla lepszego dostosowania potomstwa do trudnych warunków środowiska oraz dla ewolucji roślin m.in. zasiedlających tereny przemysłowe.

Na zaburzonych, terenach pogórnicznych (hałdach, nieużytkach) panują bardzo trudne warunki do życia roślin, tj. silne wiatry i nasłonecznienie, niewłaściwa struktura gleby z wysoką zawartością metali ciężkich przy równoczesnym niedoborze związków odżywczych oraz niedostatek wody (n.p. Baker i in. 2010). Na takich obszarach występuje specyficzna roślinność składająca się z gatunków, które wykształciły tolerancję na wysokie stężenia metali ciężkich w glebie. Rośliny charakteryzujące się wysoką adaptacją noszą nazwę

metalofitów i zostały opisane w ponad 30 rodzinach roślin okrytonasiennych, z których najbogatsze w gatunki o wysokiej tolerancji na metale ciężkie są: Asteraceae (astrowate), Brassicaceae (kapustowate), Caryophyllaceae (goździkowate), Plumbaginaceae (ołownicowate), Poaceae (wiechlinowate), Violaceae (fiołkowate) (Wierzbicka i Rostański 2002, Siwek 2008b, Bothe i Słomka 2017, Sychta i in. 2018). W zależności od czasu jaki gatunek miał na adaptację, koszty tolerancji związane z reprodukcją są różne. Im krótszy czas, np. kilka pokoleń, zakłócenia są większe i obniża się płodność roślin.

Z badań nad biologią rozmnażania osobników zasiedlających trudne do życia obszary po górnictwie rud metali wynika, że struktury kwiatu (zarówno płonne, jak i generatywne), a także procesy embriologiczne na wszystkich etapach rozwoju (gametofitów, gamet, zarodków), wykazują zakłócenia, degeneracje w porównaniu z przebiegiem tych procesów u osobników z populacji referencyjnych (z terenów niezanieczyszczonych metalami ciężkimi) (Izmańłow 2000, Słomka i in. 2012, Kwiatkowska i Izmańłow 2014). Zaburzenia te to najczęściej: obumieranie pąków kwiatowych, kwiatów, komórek linii generatywnej męskiej i żeńskiej, degeneracje lub brak gametofitów, obumieranie komórek w gametofitach, zaburzenia w rozwoju zarodków, obumieranie pojedynczych komórek lub grup komórek w ciele zarodka, zaburzenia w wytwarzaniu tkanki odżywczej (bielma). Takie nieprawidłowości obserwowane w trakcie przebiegu procesów rozmnażania płciowego obniżają ilość zawiązywanych nasion i liczebność następnego pokolenia. Z badań wynika, iż rozwój struktur generatywnych i przebieg procesów generatywnych może świadczyć o stopniu przystosowania osobników do ekstremalnego środowiska. Im zakłócenia i degeneracje jest mniej tym populacja jest bardziej przystosowana do środowiska. Jeśli populacja badanego taksonu jest na wczesnym etapie kolonizacji, zaburzeń w reprodukcji jest więcej niż w populacjach dobrze przystosowanych metalofitów, które już wykształciły adaptacje w fazie sporofitowej (Czapik 2002, Przedpełska i Wierzbicka 2007, Siwek 2008a, Słomka i in. 2012, Kwiatkowska i Izmańłow 2014, Izmańłow i in. 2015). Zatem można przyjąć, że miarą przystosowania osobników do środowiska jest skala zaburzeń i degeneracji w strukturach

³ Mejoza – typ podziału komórkowego, w którym z diploidalnej komórki macierzystej powstają cztery komórki haploidalne. Stanowi podstawę do rozmnażania płciowego. U roślin wyznacza przejście fazy diploidalnej (sporofit) w fazę haploidalną (gametofit). W pierwszym podziale mejotycznym zachodzi redukcja liczby chromosomów. W wyniku rekombinacji chromosomów i genów komórki haploidalne mają inną od komórki macierzystej kombinację genów, co w efekcie prowadzi do zwiększenia bioróżnorodności. Drugi podział mejotyczny jest podobny do podziału mitotycznego. Należy równocześnie podkreślić, że termin „mejoza” dotyczy przemian jądra komórkowego. Najczęściej towarzyszy mu proces podziału cytoplazmy – cytokineza. Jednak w świecie roślin nie zawsze mejozie towarzyszy cytokineza np. rozwój tetrasporowy woreczka załączkowego.

⁴ Mikrospora – komórka haploidalna (n) powstała po podziale mejotycznym, w wyniku mejozy w linii męskiej powstaje tetradą mikrospor, układ mikrospor w tetradzie różny.

⁵ Megaspora – komórka haploidalna (n) powstała po podziale mejotycznym, w wyniku mejozy w linii żeńskiej tworzy się tetradą megaspor, najczęściej megasporę w układzie liniowym.

odpowiedzialnych za rozmnażanie płciowe, a także w przebiegu procesów reprodukcyjnych.

Analizą przebiegu procesów rozmnażania u osobników z terenów zaburzonych, antropogenicznych, zajmuje się embriologia ekologiczna (Czapik 2002). Jest ona dobrym narzędziem do oszacowania stopnia przystosowania się osobników do środowiska. Badanie dostosowania roślin wyrażone przebiegiem procesów płciowych wydaje się komplementarnym do badania stopnia ich przystosowania na poziomie sporofitów. Takie podejście do *B. laevigata* przedstawiono w tym rozdziale.

Biologia rozmnażania *B. laevigata* z hałdy galmanowej

Z informacji na temat fazy sporofitowej *B. laevigata* z hałd pogórnich okolic Olkusza (galmanowych – z glebą silnie zanieczyszczoną cynkiem, ołowiem i kadmem) w odniesieniu do strategii życia, struktury genetycznej populacji tego gatunku (Bemowska-Kałużun i in. – Rozdział 5, 6, niniejszy tom) wynika, iż badane osobniki są diploidalne ($2n = 2x = 18$, czyli posiadają po dwa zestawy 9 chromosomów). Zatem w opisie przebiegu procesów embriologicznych pleszczotki górskiej można z całą pewnością wykluczyć zaburzenia wynikające z mieszańcowości i/lub poliploidyzacji. Stwierdzone w toku procesów embriologicznych zaburzenia oraz procesy degeneracyjne odnoszą się tylko do wpływu środowiska, w którym rosną osobniki.

Przedstawiona w niniejszym rozdziale analiza oddziaływania środowiska na reprodukcję *B. laevigata* w populacjach galmanowych obejmuje opis następujących struktur i procesów embriologicznych: pręcików i zalążków, w których wyróżnicowują się komórki macierzyste mikrospor i megaspor (mikrosporocyty i megasporocyty), przebieg podziału mejotycznego i rozwój gametofitu męskiego (ziarna pyłku) i gametofitu żeńskiego (woreczka zalążkowego) z wytworzeniem męskich i żeńskich jednostek generatywnych, przebieg procesu podwójnego zapłodnienia, tworzenie nasion, w których rozwija się zarodek w procesie embriogenezy. Badaniem objęto osobniki z populacji galmanowej z hałd pogórnich w Bolesławiu wraz z populacją odniesienia (referencyjną), z doliny Jaworzynki z Tatr.

Organem bezpośrednio zaangażowanym w rozmnażanie płciowe jest kwiat. Kwiat u *B. laevigata* jest obupłciowy, słupek górny jest złożony z dwóch owocolistków, z dwoma kampylotropowymi zalążkami. Pręciki są czterosiłne, czyli cztery dłuższe i dwa krótsze (Ryc. 1: 2, 3). W pręcikach, w komorach pyłkowych, w otoczeniu komórek tapetum tworzą się w dwóch etapach, po mikrosporogenezie⁶ (w której kluczowym jest podział redukcyjny, mejoza komórki macierzystej i rekombinacja) i mikrogametofitogenezie⁷, gametofity męskie – ziarna pyłku, które dojrzałe, w stadium pylenia, są trzykomórkowe i zawierają komórkę wegetatywną i dwie komórki plemnikowe (Ryc. 1: 4b, 5b). W zalążni słupka, w zalążkach, podobnie jak w linii męskiej, po megasporogenezie⁸ (w której znów kluczowym jest podział redukcyjny, mejoza komórki macierzystej i rekombinacja) i megagametofitogenezie⁹, tworzy się gametofit żeński – woreczek zalążkowy. U *B. laevigata* woreczek zalążkowy rozwija się według typu *Polygonum* (monosporowy, z megaspori chazalalnej, po trzech mitozach,

⁶ Mikrosporogeneza – proces powstawania mikrospor w wyniku podziału mejotycznego komórki macierzystej mikrospor (mikrosporocyty). n – haploidalna liczba chromosomów. Połowa somatycznej liczby chromosomów ($2n$). Haploidalna liczba chromosomów występuje w komórkach po podziale mejotycznym. Komórki haploidalne u roślin to megaspori, mikrospor (z nich tworzą się gametofity) i ich pochodne, gamety – komórka jajowa, komórki plemnikowe.

⁷ Mikrogametofitogeneza – rozwój gametofitu męskiego, po pierwszym podziale mitotycznym mikrospor powstaje komórka generatywna i komórka wegetatywna, po drugim podziale, któremu podlega tylko komórka generatywna, powstają 2 komórki plemnikowe.

⁸ Megasporogeneza – proces powstawania megaspor w wyniku podziału mejotycznego komórki macierzystej megaspor (megasporocyty).

⁹ Megagametofitogeneza – rozwój gametofitu żeńskiego, po pierwszej mitozie megaspori funkcjonalnej powstaje 2-jądrowy gametofit żeński (woreczek zalążkowy, WZ), po dwóch kolejnych cyklach mitoz powstaje odpowiednio 4-jądrowy i 8-jądrowy WZ, który przekształca się w 7-komórkowy dojrzały WZ. Na biegunie mikropylarnym WZ zlokalizowany jest aparat jajowy (komórka jajowa + 2 synergidy), centralnie, komórka centralna, w skład której wchodzi 2 jądra biegunowe, które po fuzji tworzą jądro wtórne, na biegunie chazalalnym, 3 antypody. Wszystkie jądra WZ są haploidalne (n), wyjątek stanowi diploidalne jądro wtórne komórki centralnej ($2n$) powstałe po fuzji 2 jąder biegunowych, (każde n).

ośmio-jądrowy). Dojrzały gametofit żeński jest siedmiokomórkowy, zbudowany z aparatu jajowego (komórka jajowa, dwie synergidy) na biegunie mikropylarnym, komórki centralnej i trzech krótko żyjących antypod na biegunie chalazalnym (Ryc. 1: 4a, 5a). Zarodek rozwija się według typu Onagrad (jeden z typów rozwoju zarodka, wyróżnionego na podstawie pochodzenia części zarodka z komórki apikalnej i bazalnej po pierwszym podziale zygoty oraz kierunku podziałów), bielmo jest jądrowe (Ryc. 1: 6). Owocem jest dwunasienna łuszczyńka (Ryc. 1: 7, 8). Z analiz porównawczych osobników z populacji z hałd galmanowych i z Tatr wynika, iż typ rozwoju gametofitu żeńskiego, typ rozwoju zarodka i bielma są to konserwatywne cechy, które nie zmieniają się pod wpływem warunków środowiska. Podobnie jak u innych przebadanych gatunków z hałd takich jak np. *Arabidopsi arenosa* (L.) Lawalrée, *Lotus corniculatus* L., *Vicia cracca* L. (Izmałłow i in. 2015). U pleszczotki górskiej z hałd nie zaobserwowano także drastycznego obumierania pąków kwiatowych, kwiatów, degeneracji gametofitów i silnego obniżenia żywotności ziaren pyłku, co obserwuje się u roślin na wczesnych etapach kolonizacji (Kościńska-Pająk 2000, Czupik 2002, Izmałłow i Biskup 2003, Siwek 2007). Rośliny tworzyły owoce, łuszczyńki, w których rozwijały się nasiona. Zatem można postawić kolejne pytanie czy zanieczyszczone środowisko ma negatywny wpływ na procesy rozmnażania *B. laevigata*?

Obserwowano pąki kwiatowe pleszczotki górskiej na kolejnych etapach rozwoju. Stwierdzono, że w niektórych degeneruje część pręcików, w pozostałych pręcikach degeneruje tylko jeden pylnik albo oba rozwijają się prawidłowo (Ryc. 2A). Mogą też degenerować wszystkie mikrospory w pylniku (Ryc. 2B). Takie obumarłe częściowo pręcikowie obserwowano aż w prawie połowie badanych pąków kwiatowych u osobników populacji hałdowej. Frekwencja degeneracji pręcików w pąkach roślin z populacji galmanowej była istotnie statystycznie wyższa od tej w populacji tatrzańskiej. Zatem w populacji z hałdy galmanowej obserwowano eliminację części męskich struktur kwiatów spowodowaną prawdopodobnie ograniczoną ilością zasobów np. pierwiastków odżywczych, tak aby pozostała część mogła się prawidłowo rozwijać i wytworzyć prawidłowe gametofity męskie. W konsekwencji

jednak obniżało to pulę żywotnego pyłku, który wytwarza pojedynczy kwiat, a także cały osobnik. Podobne zjawisko zaobserwowano u innego gatunku muraw galmanowych, u *Armeria maritima* (Mill.) Willd. (obserwacje własne).

Eliminacja części struktur generatywnych u roślin z populacji galmanowej obserwowana była także w linii żeńskiej. W załączni zahamowany był rozwój jednego z dwóch zalążków (najczęściej w stadium gametofitogenezy lub dojrzałego gametofitu), w drugim zalążku występował dojrzały, prawidłowy gametofit żeński (Ryc. 3A). Jest to skutkiem wykształcenia strategii dojrzewania mniejszej liczby, ale prawidłowych zalążków, a w nich gametofitów, które mają szanse na zapłodnienie i przekształcenie się w prawidłowe nasiona w środowisku ograniczonych zasobów (De Jong i Klinkhamer 2005). Zaobserwowano również w kilku procentach zalążków, tylko z populacji galmanowych, skrócenie woreczków zalążkowych, czyli wcześniejsze wejście w fazę dojrzałości gametofitu żeńskiego, przed osiągnięciem właściwego dla tego taksonu rozmiaru i kształtu woreczka zalążkowego (Ryc. 3B). Takie wcześniejsze wejście w fazę generatywną cechuje również inne rośliny muraw galmanowych (Wierzbicka i Rostański 2002). Degeneracje komórek w linii żeńskiej obserwowane były w kilkunastu procentach badanych zalążków u roślin z populacji galmanowej (Ryc. 3C). Dodatkowo, w kilku procentach analizowanych zalążków z populacji galmanowej obserwowano dojrzałe, prawidłowe gametofity żeńskie, które obumierały wraz z zalążkiem w wyniku braku zapylenia (Ryc. 3D). Prawdopodobnie brak zapylaczy ograniczał płodność roślin.

U badanych osobników z hałd galmanowych degeneracje dotyczyły również zalążków na późniejszym etapie rozwoju. Obok normalnie rozwijających się zarodków i bielma (Ryc. 4A, B), obserwowano obumieranie całych zalążków (Ryc. 3C). Degeneracje komórek linii żeńskiej odpowiadały frekwencji jednonasiennych łuszczynek oraz tych, w których brakuje obu nasion, a które występują obok prawidłowych dwunasiennych łuszczynek (Ryc. 4D, E), co prawdopodobnie było konsekwencją eliminacji części zalążków lub brakiem zapłodnienia prawidłowych woreczków zalążkowych.

W nasionach, a dokładniej w zarodkach osobników z populacji galmanowej stwierdzono zmiany

w składzie ściany komórkowej. Pojawiła się w niej frakcja pektyn (homogalakturonany wysokoestryfikowane), które uważane są za wiążące i detoksyfikujące metale (Krzyszowska 2011). Wynika z tego, iż na poziomie nasion, czyli w kolejnym pokoleniu, u pleszczotki górskiej obserwuje się adaptacje do środowiska, wiązanie metali w apoplazmie (zespole ścian komórkowych). Aktualnie badania Auterek niniejszego rozdziału, koncentrują się na analizie składu ścian komórkowych w komórkach linii generatywnej. Poszukują one odpowiedzi na pytanie na jakim etapie rozwoju komórek linii haploidalnej (megasporocyt, megaspory, komórki woreczka zalążkowego na etapie przed i po zapłodnieniu) pojawia się różnica w składzie ścian komórkowych, która wpływa na wykształcenie adaptacji do środowiska wzbogaconego w metale ciężkie.

Podsumowanie

U *B. laevigata* z hałd galmanowych obserwuje się zaburzenia w procesach embriologicznych. Zaobserwowane jednak częściowe tylko degeneracje struktur i komórek linii generatywnej (zarówno męskiej, jak i żeńskiej) mogą być podstawą wykształcenia strategii adaptacyjnej polegającej na eliminacji części struktur kwiatowych w warunkach ograniczenia zasobów, tak aby pozostałe struktury mogły się prawidłowo rozwinąć a osobnik mógł osiągnąć sukces reprodukcyjny (wytworzenie nasion). Zatem z obserwacji

embriologicznych badanego metalofitu wynika, iż populacje galmanowe żyjące w ekstremalnych warunkach niedoborów związków odżywczych i wody przy dużej ilości metali w podłożu, przez dziesiątki pokoleń wykształciły strategię adaptacyjną na poziomie fazy gametofitowej.

Kolejną adaptacją dostrzeżoną w rozwoju fazy haploidalnej jest przyspieszenie dojrzewania gametofitu żeńskiego, zanim osiągnie on prawidłową wielkość i właściwy, kampylotropowy kształt (silne skrócenie woreczków zalążkowych, jednocześnie komórki prawidłowo wykształcone), aby zwiększyć szansę na zapylenie i zapłodnienie.

Stwierdzono również iż czynnikiem ograniczającym ilość wytwarzanych przez pleszczotkę górską nasion może być także brak wystarczającej liczby zapylaczy, co objawia się obumieraniem części prawidłowo wykształconych, niezapłodnionych gametofitów.

Adaptacją pleszczotki górskiej do nadmiaru metali ciężkich w glebie hałd pogórnicych wydaje się być zmiana składu chemicznego ściany komórkowej zarodka, pojawienie się związków unieruchamiających metale docierające do nasion. Dalsze badania w tym zakresie pozwolą odpowiedzieć na pytanie dotyczące momentu, w którym ta adaptacja powstaje. Być może jest ona dziedziczona w linii żeńskiej i już w fazie haploidalnej zmienia się skład ściany komórkowej wszystkich lub tylko jednej komórki – jajowej, a w konsekwencji zygoty i zarodka.