

**„Budowa i rozwój gametofitu żeńskiego u wybranych przedstawicieli
rodzaju *Sedum* (Crassulaceae)”
mgr Emilia Brzezicka**

Zalążek roślin okrytonasiennych rozwija się w obrębie zalążni słupka. Dojrzały, zwykle siedmiokomórkowy gametofit żeński (woreczek zalążkowy) powstaje w ośrodku zalążka w wyniku dwóch następujących po sobie procesów tj. megasporogenezy i megagametogenezy. W zależności od przebiegu i wyniku tych procesów wyróżnia się typy rozwoju gametofitu żeńskiego, które podzielono na trzy zasadnicze grupy (woreczki zalążkowe mono-, bi- i tetrasporowe). Podział ten zależy od liczby jąder komórkowych uczestniczących w budowie megaspory funkcjonalnej tworzącej się z megasporocytu w trakcie megasporogenezy. Odmienny wynik tego procesu jest związany z obecnością/brakiem cytokinezy po pierwszym oraz drugim podziale mejotycznym [1]. Podczas megagametogenezy, megaspory funkcjonalna (komórka macierzysta woreczka zalążkowego) przechodzi określoną liczbę cykli mitotycznych, co prowadzi do formowania wolnojądrowego, a po cytokinezie komórkowego gametofitu żeńskiego, który pełni istotną rolę w rozmnażaniu roślin. Badania nad rozwojem, budową i ultrastrukturą woreczka zalążkowego są szeroko rozpowszechnione u roślin okrytonasiennych, jednak nadal aktualne pozostają pytania odnoszące się m.in. do funkcji komórek gametofitu żeńskiego, w tym antypod, które stanowią najbardziej zmienny, często efemeryczny element struktury gametofitu żeńskiego [2].

Badania na poziomie ultrastrukturalnym skojarzone z metodami cytochemicznymi nie zostały jak do tej pory wykonane podczas megasporogenezy i megagametogenezy w obrębie Crassulaceae. Dotychczas badania z zastosowaniem wymienionych technik badawczych zrealizowano wśród wybranych reprezentantów tej rodziny, jednak koncentrowały się one na procesach obserwowanych po zapłodnieniu tj. rozwoju zarodka, haustoriów wieszadełka oraz bielma. Dane te stanowią m.in. pierwsze wśród roślin okrytonasiennych doniesienie w literaturze światowej o obecności charakterystycznych dla Crassulaceae plazmodesm z przylegającym elektronowo-gęstym materiałem w wieszadełku zarodkowym gatunków z rodzajów *Sempervivum*, *Jovibarba*, *Graptopetalum*, *Aeonium*, *Monanthes*, *Aichryson* i większości *Sedum* (Crassulaceae) [3-8]. Wykonane analizy stanowiły dodatkowy, ważny argument przemawiający za zasadnością kontynuowania badań embriologicznych nad gatunkami gruboszowatymi.

W świetle dostępnych danych embriologicznych na temat gatunków Crassulaceae, konieczne stało się zastosowanie nowych, dotychczas niewykorzystywanych technik badawczych w celu poszerzenia wiedzy z zakresu budowy i rozwoju gametofitu żeńskiego w obrębie tej rodziny. Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było przeprowadzenie analiz porównawczych nad anatomią, ultrastrukturą i cytochemią komórek formujących się w trakcie megasporogenezy i megagametogenezy u trzech gatunków z rodzaju *Sedum* (*S. hispanicum* L., *S. sediforme* (Jacq.) Pau i *S. rupestre* L.) z tej rodziny. Realizacja zaplanowanych badań miała na celu prześledzenie, opisanie i określenie typu

megasporogenezy i megagametogenezy u tych gatunków, przy jednoczesnej obserwacji i analizie budowy anatomicznej załączka. Zaprezentowane w rozprawie doktorskiej wyniki badań poddano analizie porównawczej w celu określenia cech wspólnych i odmiennych dla badanych gatunków *Sedum*.

Badane gatunki należą do największego w obrębie rodziny Crassulaceae rodzaju *Sedum* (obejmującego około 420 gatunków), który jest silnie polifiletyczny [9-10]. Ponadto *S. sediforme* i *S. rupestre* to gatunki zaliczane do wyróżnianej w obrębie rodzaju *Sedum* serii *Rupestris*, która bywa podnoszona również do rangi rodzaju – *Petrosedum* Grulich [10-11]. Cechy morfologiczne gatunków z ser. *Rupestris* (w odniesieniu do innych przedstawicieli rodzaju) oraz wyniki analiz molekularnych ujawniają odmienny charakter tej grupy roślin [10-11]. Poddane analizom gatunki z ser. *Rupestris* oraz *S. hispanicum* są zaliczane do różnych kladów tj. odpowiednio *Sempervivum* i *Leucosedum* [10]. W związku z powyższym, dodatkowym celem pracy było sprawdzenie i określenie czy istnieje zależność między otrzymanymi podczas zaplanowanych badań wynikami, a pozycją systematyczną wybranych gatunków. Podjęta problematyka wydała się ciekawa w kontekście opisanych dotychczas obserwacji embriologicznych. Wyłącznie wśród zbadanych gatunków z ser. *Rupestris* (*S. sediforme* i *S. rupestre*) nie obserwowano obecności unikatowych dla Crassulaceae plazmodesm z przylegającym elektronowo-gęstym materiałem, które obserwowano we wcześniejszych pracach w wieszadełku zarodkowym. Ponadto, jedynie gatunki *Sedum* ser. *Rupestris* charakteryzują się formowaniem wieszadełka o filamentowej budowie wśród Crassulaceae [3,8,12]. Różnic w strukturze komórek i przebiegu badanych procesów spodziewano się również podczas formowania gametofitu żeńskiego u wybranych do analiz gatunków. Zatem, w pracy poddano weryfikacji hipotezę, iż gatunki *Sedum* wykazują zróżnicowanie w przebiegu formowania się i strukturze komórek powstałych w trakcie megasporogenezy i megagametogenezy.

Monosporowy typ megasporogenezy oraz woreczek załączkowy typu *Polygonum* są najczęściej opisywanymi u roślin okrytonasiennych, w tym u większości przedstawicieli rodziny Crassulaceae. Według dotychczasowej literatury u *Sedum* występuje typ *Polygonum* i *Allium* [11-15]. Natomiast obecność bisporowych woreczków załączkowych typu *Scilla/Endymion* podawana jest jednak w wątpliwość [15]. Ponadto, wśród niektórych gatunków Crassulaceae, w tym głównie z rodzaju *Sedum* opisano występowanie haustoriów synergid, antypod oraz megaspor [16]. Struktury te nie były wcześniej badane w aspekcie ultrastrukturalnym i cytochemicznym w obrębie rodziny. W świetle powyższych faktów, dodatkowym celem niniejszej rozprawy doktorskiej była weryfikacja obecności haustoriów w trakcie megasporogenezy i megagametogenezy.

Materiał badawczy stanowiły załączki na różnych etapach rozwoju, wyizolowane z pąków kwiatowych i świeżo otwartych kwiatów wybranych gatunków *Sedum*. Do analiz rozwoju i budowy anatomicznej zastosowano techniki: przejaśniania załączków, skrawków półcienkich podbarwianych metodami cytochemicznymi oraz obserwację w mikroskopie świetlnym, w tym z kontrastem Nomarskiego. Obserwację rozmieszczenia i zmian w

zawartości głównych grup związków organicznych, prowadzono po wcześniejszym selektywnym wybarwieniu lipidów, białek oraz nierozpuszczalnych polisacharydów. W celu poznania submikroskopowej budowy komórek formujących się w trakcie megasporogenezy oraz megagametogenezy wykorzystano transmisyjną mikroskopię elektronową. Procedury utrwalania i przygotowywania materiału roślinnego do analiz zależały od stosowanej metody badawczej.

Badania podjęte w ramach przygotowywanej pracy doktorskiej przyczyniły się do kompleksowego przedstawienia rozwoju gametofitu żeńskiego gatunku *S. hispanicum* [17] oraz pierwszego opisanie i określenia typu rozwoju woreczka zalążkowego *S. sediforme* [18] i *S. rupestre* [19]. Publikacje prezentują kolejno wyniki uzyskane dla każdego z gatunków.

Niezależnie od przebiegu i rezultatu megasporogenezy, wśród wszystkich badanych rozchodników obserwowano monosporowy typ megasporogenezy. Polarna budowa mejocytu przejawia się w rozmieszczeniu plazmodesm, które znajdują się w ścianach w chalazalnej części komórki. Megaspory funkcjonalna jest zawsze komórką jednojądrową, która powstaje po mejozie i cytokinezie na biegunie chalazalnym liniowej triady lub tetrady. W zalążkach obserwowano zawsze tylko jeden woreczek zalążkowy, którego rozwój jest zgodny z typem megagametogenezy - *Polygonum*. Zalążek u wszystkich badanych gatunków jest anatropowy, dwuosłonkowy i grubośrodkowy (*nucellus* typu *Sedum*). Analizy mikroskopowe przeprowadzone na poszczególnych etapach rozwoju megaspor i gametofitu żeńskiego pozwalają stwierdzić, iż badane gatunki nie wykazują tworzenia haustoriów zarówno podczas megasporogenezy jak i megagametogenezy.

Przebieg formowania się megaspor oraz struktura powstałych w trakcie megasporogenezy komórek różni się u badanych reprezentantów rodzaju *Sedum*, co znajduje również odzwierciedlenie w pozycji systematycznej tych roślin. Gatunki z rodzaju *Sedum* ser. *Rupestria* charakteryzują się formowaniem triady komórek z których, tylko jedna, położona najbliższej mikropyle jest komórką dwujądrową. Wynik otrzymany podczas badań jest związany z zahamowaniem mechanizmu cytokinezy w obrębie niefunkcjonalnej komórki triady. Dotychczas, tego typu budowę triady opisano jako dodatkowy, możliwy wynik megasporogenezy wśród gatunków Crassulaceae. Wnioskuje zatem, że jest to pierwsza tego typu obserwacja w obrębie rodziny, dokonana wyłącznie wśród gatunków *Sedum* ser. *Rupestria*, jednak dalsze badania są niezbędne, aby stwierdzić, że jest to cecha charakterystyczna i wspólna dla tej grupy roślin. Odmienny wynik procesu megasporogenezy obserwowano u *S. hispanicum*. W zalążkach tego gatunku, zawsze jedna liniowa tetrad megaspor formuje się w mikropylarnej części ośrodka.

W procesie megagametogenezy powstaje gametofit żeński, który u badanych *Sedum* zbudowany jest początkowo z siedmiu komórek. Położone na biegunie chalazalnym woreczka zalążkowego trzy antypody są strukturami efemerycznymi. Ostatecznie uformowany, dojrzały gametofit żeński zbudowany jest z komórek aparatu jajowego (dwóch synergid i komórki jajowej) oraz komórki centralnej. Wykonane barwienia cytochemiczne pozwoliły ustalić, iż w obrębie komórek rozwijającego się gametofitu żeńskiego *Sedum* obecne są białka, lipidy oraz

nierozpuszczalne polisacharydy. Na etapie jądrowego woreczka, wyraźnie widoczny jest intensywny proces gromadzenia materiałów zapasowych w gametoficie żeńskim, co jest związane z jednoczesną degeneracją niefunkcjonalnych megaspor i otaczających komórek ośrodka.

W trakcie dojrzewania, komórki gametofitu żeńskiego *Sedum* stają się bogate w organelle komórkowe. Ultrastruktura synergid oraz komórki centralnej wskazuje na ich stosunkowo większą aktywność metaboliczną w porównaniu do komórki jajowej. Synergidy stają się komórkami aktywniejszymi wraz z postępującym zanikiem antypod. Wyniki wskazują, że antypody (*S. sediforme*, *S. rupestre*) oraz synergidy badanych rozchodników mają charakter komórek transferowych. Wrośty ściany w mikropylarnej części synergid tworzą aparat włókienkowy, który ułatwia wydzielanie i absorpcję substancji. Ponadto, występowanie dobrze rozwiniętych organelli (m.in. aktywne diktiosomy, profile retikulum endoplazmatycznego, mitochondria położone często w pobliżu wrostów ściany) w cytoplazmie tych komórek wskazuje na ich wysoką aktywność metaboliczną. Wyniki badań ultrastrukturalnych wskazują, że biegun mikropylarny i chalazalny woreczka zalążkowego *Sedum* są predysponowane do intensywnego transportu substancji. Zarówno antypody, jak i synergidy uczestniczą w odżywianiu i transporcie substancji odżywczych dla rozwijającego się megagametofitu. Ponadto, wszystkie komórki woreczka zalążkowego są ze sobą połączone plazmodesmami, co umożliwia intensywny przepływ substancji odżywczych w obrębie woreczka zalążkowego.

Zaplanowane w ramach mojej rozprawy doktorskiej badania ultrastrukturalne umożliwiły zweryfikowanie i potwierdzenie hipotezy, iż w trakcie megasporogenezy i megagametofitogenezy wybranych gatunków z rodzaju *Sedum* (Crassulaceae) formują się charakterystyczne, unikatowe dla tej rodziny plazmodesmy z elektronowo-gęstym materiałem. Ponadto, na przykładzie gatunków z ser. *Rupestria* potwierdzono hipotezę, iż brak formowania plazmodesm w trakcie embriogenezy nie wyklucza możliwości ich formowania na wcześniejszych (w stosunku do embriogenezy) etapach rozwoju tj. megasporogenezy i megagametogenezy. Otrzymane przeze mnie wyniki ujawniają cechy budowy komórek rozwijającego się gametofitu żeńskiego, które nie były dotąd opisywane u innych roślin. Ściany megaspor *S. hispanicum* wykazują obecność prostych plazmodesm, do których przylega elektronowo-gęsty materiał. Zbudowane w ten sposób połączenia międzykomórkowe są również widoczne w ścianach megaspor funkcjonalnej i jądrowego woreczka zalążkowego tego gatunku. W zalążkach *S. sediforme* i *S. rupestre* stwierdzono obecność plazmodesm z elektronowo-gęstym materiałem wyłącznie na etapach megagametofitogenezy (jądrowy woreczek zalążkowy, ściany zewnętrzne antypod). Antypody gatunków z ser. *Rupestria* wykazują podobieństwo budowy (obecność wrostów ściany i plazmodesm z elektronowo-gęstym materiałem w chalazalnych ścianach tych komórek). Na podstawie dostępnej literatury [20] i wykonanych obserwacji, można przypuszczać, że opisane plazmodesmy z elektronowo-gęstym materiałem w zewnętrznych ścianach megaspor/jądrowego gametofitu/antypod są funkcjonalne a ich obecność może

wpływać na komunikację symplastową między komórkami rozwijającego się gametofitu żeńskiego, a otaczającymi komórkami ośrodka u *Sedum*.

Podsumowując, wyniki otrzymane w ramach niniejszej pracy doktorskiej uzupełniają i dostarczają nowej wiedzy z dziedziny cytoembriologii trzech gatunków z rodzaju *Sedum*. Na podstawie szczegółowych analiz rozwoju i struktury komórek gametofitu żeńskiego wykazano podobieństwo cech embriologicznych wśród gatunków *Sedum* ser. *Rupestris* (klad *Sempervivum*), odróżniających je od gatunku *S. hispanicum* (klad *Leucosedum*). W mojej pracy dowiodłam, że gatunki *Sedum* wykazują zróżnicowanie w rozwoju gametofitu żeńskiego, które dotyczy przebiegu megasporogenezy, struktury komórek powstających w trakcie megasporogenezy i formowania woreczka zalążkowego. Badania umożliwiły wyciągnąć wniosek, iż obecność plazmodesm z elektronowo-gęstym materiałem jest cechą unikatową dla wszystkich dotychczas zbadanych na poziomie ultrastrukturalnym gatunków Crassulaceae (w tym *S. sediforme* i *S. rupestre*). Zaprezentowane w rozprawie doktorskiej wyniki badań mogą być wykorzystane jako wsparcie w rozwiązywaniu bieżących problemów taksonomicznych w obrębie rodzaju *Sedum*. Co więcej, uzyskane przeze mnie wyniki stanowią podstawę do kontynuacji badań w obszarze embriologii eksperymentalnej w zakresie komunikacji symplastowej w trakcie megasporogenezy i megagametogenezy.

Literatura

1. Yang WC (2006) Female gametophyte development. W: Basra AS (red) Handbook of seed science and technology. Haworth Press, New York, s. 27–62
2. Willemse MTM, Van Went JL (1984) The female gametophyte. W: Johri BM (red) Embryology of angiosperms. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, s. 159–196
3. Czaplejewicz D, Kozieradzka-Kiszkurno M (2013) Ultrastructural and cytochemical studies of the embryo suspensor of *Sedum reflexum* L. (Crassulaceae). Acta Biol Cracov Ser Bot 55:276–89. DOI: 10.2478/abscb-2013-0028
4. Kozieradzka-Kiszkurno M, Bohdanowicz J (2010) Unusual electron-dense dome associates with compound plasmodesmata in the embryo-suspensor of genus *Sedum* (Crassulaceae). Protoplasma 247:117–120. DOI: 10.1007/s00709-010-0133-9
5. Kozieradzka-Kiszkurno M, Płachno BJ (2012) Are the symplastic connections between the endosperm and embryo in same angiosperms? - a lesson from the Crassulaceae family. Protoplasma 249(4):1081–1089. DOI: 10.1007/s00709-011-0352-8
6. Kozieradzka-Kiszkurno M, Płachno BJ, Bohdanowicz J (2011) Are unusual plasmodesmata in the embryo-suspensor restricted to species from the genus *Sedum* among Crassulaceae? Flora 206(7):684–690. DOI: 10.1016/j.flora.2010.11.017
7. Kozieradzka-Kiszkurno M, Płachno BJ, Bohdanowicz J (2012) New data about the suspensor of succulent angiosperms: ultrastructure and cytochemical study of the embryo-suspensor of *Sempervivum arachnoideum* L. and *Jovibarba sobolifera* (Sims) Opiz. Protoplasma 249(3):613–624. DOI: 10.1007/s00709-011-0297-y

8. Koziaradzka-Kiszkurno M, Majcher D, Brzezicka E, Rojek J, Wróbel-Marek J, Kurczyńska E (2020) Development of embryo suspensors for five genera of Crassulaceae with special emphasis on plasmodesmata distribution and ultrastructure. *Plants* 9(3):320. DOI: 10.3390/plants9030320
9. Hart H't, Bleij B (2003) *Sedum*. W: Egli U (red) Illustrated handbook of succulent plants. Crassulaceae. Springer, Berlin, s. 235–332
10. Nikulin VY, Gontcharova SB, Stephenson R, Gontcharov AA (2016) Phylogenetic relationships between *Sedum* L. and related genera (Crassulaceae) based on ITS rDNA sequence comparisons. *Flora* 224:218–229. DOI: 10.1016/j.flora.2016.08.003
11. Thiede J, Egli U (2007) Crassulaceae. W: Kubitzki K (red) The families and genera of vascular plants. Springer Verlag, Berlin, s. 83–118
12. Mauritzon J (1933) Studien über die Embryologie der Familien Crassulaceae und Saxifragaceae. Thesis, University of Lund, Lund
13. Johri BM, Ambegaokar KB, Srivastava PS (1992) Comparative embryology of angiosperms. Springer Verlag, Berlin
14. Wojciechowicz MK, Samardakiewicz M (1998) The development of female gametophyte and antipodal embryo formation in *Sedum fabaria*. *Biol Plant* 40(2):193–202
15. Herr JM (1984) Embryology and taxonomy. W: Johri BM (red) Embryology of angiosperms. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, s. 647–696
16. Johri BM, Ambegaokar KB (1984) Embryology: then and now. W: Johri BM (red) Embryology of angiosperms. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, s. 1–47
17. **Brzezicka E, Koziaradzka-Kiszkurno M (2018) Ultrastructural and cytochemical aspects of female gametophyte development in *Sedum hispanicum* L. (Crassulaceae). *Protoplasma* 255(1):247–261. DOI:10.1007/s00709-017-1155-3**
18. **Brzezicka E, Koziaradzka-Kiszkurno M (2019) Female gametophyte development in *Sedum sediforme* (Jacq.) Pau (Crassulaceae): an anatomical, cytochemical and ultrastructural analysis. *Protoplasma* 256(2):537–553. DOI:10.1007/s00709-018-1319-9**
19. **Brzezicka E, Koziaradzka-Kiszkurno M (2020) Developmental, ultrastructural and cytochemical investigations of the female gametophyte in *Sedum rupestre* L. (Crassulaceae). *Protoplasma*. DOI: 10.1007/s00709-020-01584-z**
20. Wróbel-Marek J, Kurczyńska E, Płachno BJ, Koziaradzka-Kiszkurno M (2017) Identification of symplasmic domains in the embryo and seed of *Sedum acre* L. (Crassulaceae). *Planta* 245(3):491–505. DOI:10.1007/s00425-016-2619-y