

MODELOWA PAPROĆ *CERATOPTERIS RICHARDII* W BADANIACH NAD FUNKCJONOWANIEM KOMÓREK ROŚLINNYCH

MODEL FERN *CERATOPTERIS RICHARDII* IN RESEARCH ON THE
FUNCTIONING OF THE PLANT CELLS

Mateusz BARTZ

Zakład Biologii Rozwoju Roślin, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział
Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski

Streszczenie: *Ceratopteris richardii* jest gatunkiem należącym do paproci cienkozarodniowych, których rozwój odbywa się w dwuetapowym cyklu przemiany pokoleń. Dominującym pokoleniem jest diploidalny sporofit produkujący zarodniki, natomiast drugim, krótkotrwałym pokoleniem jest haploidalny gametofit, wytwarzający gamety. Biologia tej paproci oraz możliwość pozyskiwania mutantów sprawiły, że została ona zaproponowana jako modelowy system do badań różnorodnych procesów rozwojowych, takich jak fotomorfogeneza, determinacja płci, apogamia i aposporia, czy reakcja grawitropijna. W pracy przeglądowej zebrano rozproszone starsze i najnowsze dane literaturowe poświęcone analizie różnych aspektów funkcjonowania i rozwoju *C. richardii*. Zaprezentowany aktualny stan wiedzy stanowi dodatkowo dobry punkt wyjścia do dalszych badań, zwłaszcza do podjęcia tematyki związanej z regulacją procesów na poziomie komórki i całego organizmu.

Słowa kluczowe: *Ceratopteris richardii*, organizm modelowy, merystem, determinacja płci, reakcja grawitropijna

Summary: *Ceratopteris richardii* is a species belonging to the leptosporangiate ferns, whose development occurs in a two-stage cycle of alternating generations. The dominant generation is a diploid sporophyte producing spores, while the second, short-lived generation is a haploid gametophyte which produces gametes. Owing to the biology and possibility to obtain viable mutants, this fern species was proposed as a model system for studying various developmental processes such as photomorphogenesis, sex determination, apogamy and apospory, and gravitropic reaction. This review gathers in one place scattered older and the latest literature data devoted to various aspects of *C. richardii* functioning and development. The current state of knowledge presented in this paper is also a good starting point for further research, especially related to the regulation of processes at the level of the cell and the entire organism.

Keywords: *Ceratopteris richardii*, model organism, meristem, sex determination, gravitropic reaction

WSTĘP

Paprocie (*Monilophyta*) należą do roślin waskularnych, które pojawiły się na Ziemi ponad 300 milionów lat temu, przed roślinami nasiennymi. W okresie karbońskim, nazywanym okresem paproci, tworzyły dominującą część roślinności. Obecnie do *Monilophyta* zalicza się ponad 10 000 gatunków, które występują na wszystkich kontynentach z wyjątkiem Antarktyki, choć faworyzują wilgotne regiony klimatu tropikalnego i umiarkowanego [23, 79]. Paprocie charakteryzuje znaczna różnorodność form wzrostu – wśród nich występują m.in. paprocie drzewiaste, wodne czy epifityczne [89]. Oprócz znaczenia ekologicznego, niektóre gatunki paproci mają również wartość ekonomiczną jako rośliny ozdobne lub źródło cennych metabolitów [79]. Paprocie wykorzystywane są też w badaniach podstawowych procesów biologicznych, prowadzonych na różnych poziomach, w tym komórkowym czy molekularnym. Jako grupa siostrzana do roślin nasiennych, o odrębnej pozycji filogenetycznej, są szczególnie istotne dla kompleksowego zrozumienia ewolucyjnego pochodzenia i dywersyfikacji cech roślin nasiennych. Do szczegółowych analiz w grupie zarodnikowych roślin waskularnych jako gatunek modelowy wybrano *Ceratopteris richardii*, który należy do najliczniejszej współcześnie grupy paproci cienkozarodniowych [46, 72, 79]. Obecnie *C. richardii* jest powszechnie wykorzystywany w badaniach mechanizmów determinacji płci, fotomorfogenezy, zachowania komórek w mikrograwitacji i stresach środowiskowych (np. zasolenia, obecności metali ciężkich) oraz analizie regulacji różnych procesów rozwojowych.

ORGANIZM MODELOWY

Ceratopteris richardii Brongn. (*Pteridaceae*) należy do paproci cienkozarodniowych i jest blisko spokrewniony z trzema innymi gatunkami: *Ceratopteris cornuta*, *C. pteridoides* i *C. thalictroides* [60, 77, 79]. W literaturze *C. richardii* znany jest także pod nazwą C-Fern. Rozwój oraz biologia paproci z rodzaju *Ceratopteris* sprawiły, że były one sukcesywnie wykorzystywane w badaniach stając się modelowymi systemami do analizy różnorodnych procesów rozwojowych [21]. Zaletą *Ceratopteris richardii* jest stosunkowo krótki cykl życiowy, który może przebiegać w ściśle kontrolowanych warunkach i trwa od trzech do czterech miesięcy [9, 45, 47]. *C. richardii* umożliwia prowadzenie badań zarówno w fazie diploidalnego sporofitu jak i – co należy podkreślić – haploidalnego, wolnożyjącego gametofitu. Jest to niewątpliwą zaletą w porównaniu do gatunków modelowych roślin nasiennych, u których gametofit uległ silnej redukcji i uzależnieniu od sporofitu [24]. Dojrzały sporofit *C. richardii* produkuje $\sim 10^6$ haploidalnych zarodników, które przechowywane w odpowiednich warunkach zachowują

żywołność przez wiele lat [9, 47, 77]. Możliwość pozyskania tak dużej liczby zarodników jest atutem w przypadku badań molekularnych, biochemicznych czy genetycznych, wymagających znacznych ilości materiału do analiz. Zarodniki *C. richardii* są podatne na mutagenезę, dzięki czemu uzyskano znaczną liczbę mutantów. Przykładem może być mutant *clumped chloroplast 1 (cp1)* wyizolowany na drodze mutagenезy indukowanej promieniowaniem X, u którego chloroplasty wraz z większością pozostałych organelli skupiają się w jednym miejscu w obrębie komórki. Analizy genetyczne wykazały, że przyczyną takiego fenotypu jest mutacja recesywna pojedynczego genu, wpływająca na nietypowy podział chloroplastu, którego ultrastruktura pozostaje jednak niezmienniona [90].

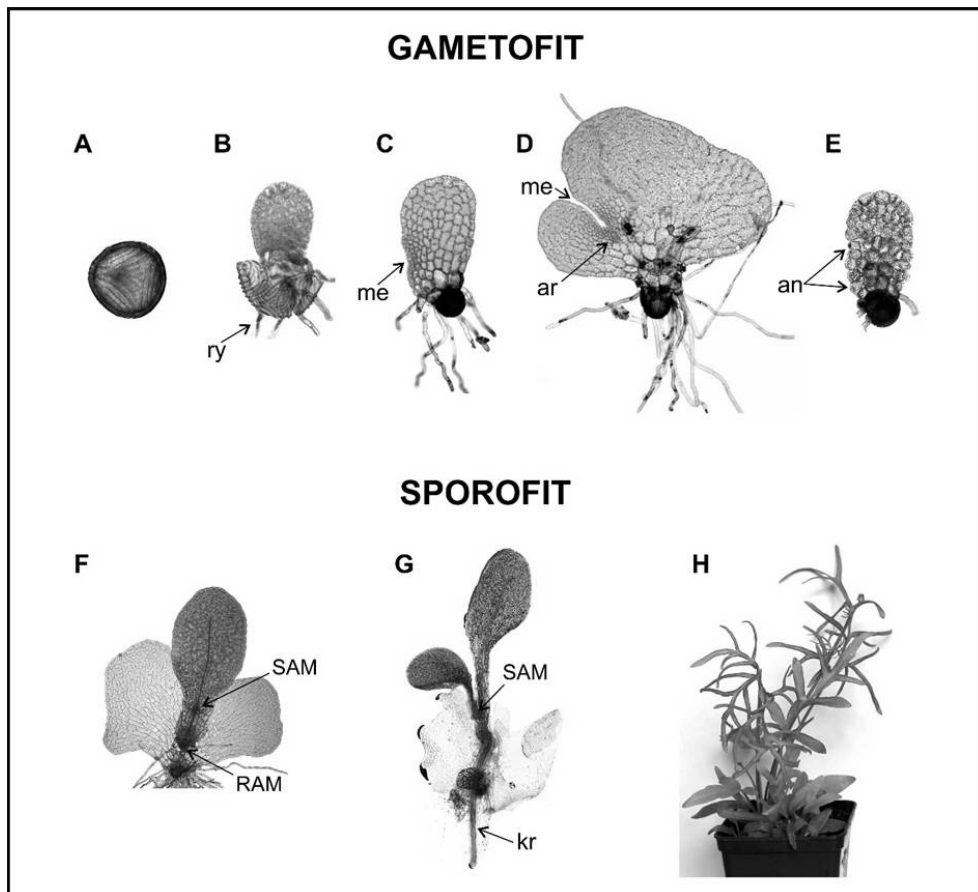
Powstające z zarodnika wolnożyjące gametofity są haploidalne, co umożliwia łatwą identyfikację zarówno mutacji dominującej jak i recesywnej [20]. Rozwój gametofitu przebiega w krótkim czasie, dojrzałość płciową osiąga on już po około dwóch tygodniach. W populacji występują gametofity hermafrodytyczne i męskie. Obecność osobników hermafrodytycznych dodatkowo umożliwia samozapłodnienie, w wyniku którego powstają sporofity, będące homozygotami w każdym *locus*. Niewielki rozmiar dojrzałych płciowo gametofitów (1-2 mm) pozwala na hodowlę znacznej liczby osobników na pojedynczej szalce Petriego [9, 45]. Także diploidalne sporofity dojrzałość reprodukcyjną uzyskują dość wcześnie, kiedy osobniki mają jeszcze niewielkie rozmiary. Sporofity mogą być również propagowane wegetatywnie z tworzących się na blaszce liściowej pąków lub rozmnózek. Dodatkową zaletą *C. richardii* w badaniach genetycznych jest obecność procesu aposporii, który polega na rozwoju diploidalnych gametofitów bezpośrednio ze sporofitu oraz procesu apogamii, w wyniku którego z gametofitu zostaje zaindukowany haploidalny sporofit [20]. Ciekawe możliwości stwarza również występowanie genetycznie odmiennych populacji allopatrycznych, których mieszańce mogą być wykorzystywane do poznania mechanizmów powstawania barier reprodukcyjnych u paproci [70].

Ważną cechą organizmów modelowych jest znajomość sekwencji genomu, co umożliwia poznanie funkcji poszczególnych genów oraz porównanie możliwych podobieństw i zmian w genomach różnych grup roślin. U *C. richardii* ze względu na duży rozmiar (11Gb) genom nie został jeszcze całkowicie zsekwencjonowany [81], choć liczba sekwencji zdeponowanych w bazach genowych cały czas rośnie [15, 21, 65, 81]. Ponadto sporządzono mapę genetyczną *C. richardii*, pokazującą lokalizację genów na chromosomach [69]. Opracowano również metody pozwalające na transformację tej modelowej paproci. Pierwsza metoda przejściowej transformacji polegała na inkubacji zarodników z dwuniciowym RNA (dsRNA) [84]. Wykorzystano także metodę biolistyczną, bombardując gametofity *C. richardii* konstruktami DNA [75]. Dopracowano także protokół stabilnej transformacji bombardując 14 dniowe eksplantanty sporofitowe zaindukowane z kalusa [73]. Stabilną transformację uzyskano również za pośrednictwem *Agrobacterium*

[12]. Znajomość metod transformacji *C. richardii* znacznie ułatwi analizy funkcjonalne genów, pozwalając na pełne wykorzystanie potencjału tego gatunku pa-proci jako organizmu modelowego [12].

CYKL ŻYCIOWY

Ceratopteris richardii rozwija się w dwuetapowym cyklu przemiany pokoleń, gdzie każde z pokoleń stanowi niezależną, wolnożyjącą i zdolną do fotosyntezy roślinę. Pokolenie dominujące jest reprezentowane przez diploidalny sporofit ($2n$), który w wyniku mejozy produkuje haploidalne zarodniki, a pokolenie generatywne stanowi krótkotrwały, haploidalny gametofit ($n=39$), wytwarzający gamety (Ryc. 1) [2, 9, 58]. Co ciekawe, wykazano, że zwykle autotroficzny gametofit przy niskim dostępie światła może stać się oportunistycznie heterotroficzny, pobierając niezbędny do wzrostu cukier z otaczającego go środowiska [1]. Rozwój gametofitu *C. richardii* rozpoczyna się od kiełkowania jednokomórkowego, bezchlorofilowego zarodnika, zawierającego materiał zapasowy w postaci białkowych i lipidowych ciał zapasowych [76]. Pierwszy podział prowadzi do wycięcia ryzoidu (chwytnika), który wyrasta po pęknięciu ściany zarodnika w miejscu trójdzielnej bruzdy aperturowej. Pozostała po wycięciu ryzoidu komórka dzieli się następnie równoległymi względem siebie podziałami, w wyniku czego powstaje 3-4 komórkowa, nitkowata forma gametofitu. Forma ta jest krótkotrwała: wszystkie komórki nitki zaczynają się dzielić w dwóch płaszczyznach, tworząc jęczyzkowy gametofit. W populacji gametofitów *C. richardii* występuje wyraźne zróżnicowanie morfologiczne na osobniki hermafrodytyczne o asymetrycznie sercowatym pokroju plechy oraz męskie, mające formę jęczyzka. U osobników hermafrodytycznych tworzy się merystem zlokalizowany po jednej ze stron plechy i dlatego też nazywany brzeżnym (marginalnym). Podziały komórek w regionie merystemu prowadzą początkowo do pojawienia się wyraźnego wgłębienia z boku plechy, a ostatecznie do utworzenia asymetrycznie sercowatego gametofitu. Poniżej wgłębienia merystematycznego tworzą się archeogonia (rodnie), natomiast anterydia (plemnie) powstają wyłącznie poza regionem merystemu – na obrzeżu plechy oraz po bokach wgłębienia. Dojrzewające archeogonia produkują pojedynczą komórkę jajową, która jest zdolna do zapłodnienia przez niecałe dwa dni, natomiast w anterydiach tworzą się spermatozoidy, które po uwolnieniu do środowiska są żywotne jedynie przez ~20 min. Dlatego też do czasu zapłodnienia ciągle produkowane są nowe gametangia [9, 24]. Spermatozoidy zaopatrzone są w liczne wici, które umożliwiają im dotarcie do komórki jajowej w obecności wody. Komórki rodni wydzielają dodatkowo substancję chemiczną, która ma za zadanie przyciągnąć szybko pływające spermatozoidy (chemotaksja dodatnia) [58, 64].



RYCINA 1. Morfologia wybranych stadiów rozwojowych gametofitu i sporofitu *Ceratopteris richardii* w trakcie cyklu życiowego. Pokolenie haploidalne – zarodnik (A), młody gametofit o języczkowatym kształcie (B), języczkowaty gametofit z zakładającym się merystemem brzeżnym (C), asymetrycznie sercowaty gametofit z funkcjonującym merystemem (D), gametofit męski (E). Pokolenie diploidalne – młody sporofit z pojedynczym liściem (F), z dwoma liśćmi i widocznym korzeniem (G), pokrój dojrzałego osobnika (H). Pomędzy zdjęciami nie jest zachowana proporcja wielkości. Legenda: ry – ryzoid, me – merystem brzeżny, ar – archegonium, an – anterydium, SAM – merystem wierzchołkowy pędu, RAM – merystem wierzchołkowy korzenia, kr – korzeń

FIGURE 1. Morphology of selected developmental stages of *Ceratopteris richardii* during the life cycle. Haploid generation – spore (A), young tongue-shaped gametophyte (B), tongue-shaped gametophyte upon the marginal meristem formation (C), asymmetrical heart-shaped gametophyte with a functioning meristem (D), male gametophyte (E). Diploid generation – young sporophyte with a single leaf (F), with two leaves and a visible root (G), habit of a mature sporophyte (H). The size ratio between photos is not maintained. Abbreviations: ry – rhizoid, me – lateral meristem, ar – archegonium, an – antheridium, SAM – shoot apical meristem, RAM – root apical meristem, kr – root

Wzrost gametofitów hermafrodytycznych kończy się wraz z zapłodnieniem komórki jajowej i powstaniem zygoty [3, 9, 10, 46]. Początkowo młody sporofit rośnie korzystając z zasobów zgromadzonych przez gametofit, który zamiera po wytworzeniu przez sporofit kilku pierwszych liści (Ryc. 1). Sporofity wykazują heterofilię (różnolistość). Jako pierwsze tworzą się małe liście wegetatywne (trofofile), początkowo całobrzegie, następnie o coraz bardziej podzielonej blaszce, aż ostatecznie tworzone są liście zarodnikowe (sporofile) o silnie powycinanej blaszce liściowej [24, 45, 50]. Na zawiniętych do wnętrza brzegach sporofili, po stronie odosiowej, rozwijają się sporangia, a w każdym z nich tworzy się 16 haploidalnych zarodników [45, 49]. Ze wzrostem liści związane jest również powstawanie korzeni, które u *C. richardii* są głównie pochodzenia pędowego i znajdują się poniżej każdego liścia [50, 51]. Cały cykl rozwojowy *Ceratopteris richardii* trwa ~120 dni [45, 47].

MERYSTEM

Rozwój i wzrost gametofitów i sporofitów *C. richardii* związany jest z obecnością merystemu, w którym, podobnie jak u większości gatunków paproci, znajduje się pojedyncza komórka apikalna. Początkowo wzrost nitkowatego gametofitu prowadzony jest przez pojedynczą komórkę apikalną, która zostaje następnie zastąpiona przez wielokomórkowy merystem zlokalizowany na jednym z brzegów plechy [9, 10, 24, 71]. Analiza aktywności podziałowej we wczesnych etapach rozwoju gametofitu nie potwierdziła jednak specyficznej funkcji komórki apikalnej, gdyż dzieliła się ona podobnie do pozostałych komórek plechy [11]. Nie oznacza to jednak, że komórki w szczytowej części gametofitu nie mogą odgrywać istotnej roli w sygnalizacji na wczesnych etapach rozwoju. Dalszy rozwój osobnika wymaga wykształcenia merystemu brzeżnego w wyniku stopniowej specyfikacji komórek merystematycznych. Proces ten może być warunkowany zmianami w dystrybucji kalozy, wyznaczającej na brzegu plechy obszar o zachowanych właściwościach merystematycznych. W merystemie brzeżnym funkcjonuje pojedyncza, prostokątna komórka inicjalna, której regularne podziały według stałego wzoru [11] prowadzą do utworzenia gametofitu o asymetrycznym sercowatym kształcie.

Pojedyncza komórka apikalna funkcjonuje również w sporoficie *C. richardii*, w merystemie wierzchołkowym pędu [24, 50]. Ma ona kształt tetraedryczny (piramidalny) i w wyniku regularnych podziałów odcina komórki pochodne, zwane merofitami. Podziały w obrębie merofitów prowadzą do wyznaczenia komórki apikalnej liścia oraz zlokalizowanej poniżej, w warstwie subepidermalnej, komórki macierzystej, z której powstanie tetraedryczna komórka apikalna korzenia [50,

51, 52]. Co ciekawe, ten sam wzór podziałów komórkowych jest zachowany od rozwoju zarodkowego, gdzie dochodzi do specyfikacji komórek inicjalnych, które kontynuują wzrost pędu i korzenia [53]. Także wzrost blaszki liściowej związany jest z obecnością szczytowo zlokalizowanych dwóch komórek inicjalnych, które mogą się dzielić według kilku alternatywnych wzorów [49].

Co ważne, za utrzymanie podziałów apikalnych komórek merystematycznych, zarówno w merystemie wierzchołkowym pędu sporofitu jak i w gametoficie przed powstaniem merystemu brzeżnego odpowiedzialny jest jeden z homologów genu *LEAFY* (*CrLFY1*) [71]. Wykazano również funkcjonowanie genu *CrWOXB*, który promuje podziały komórek oraz odpowiada za rozwój organów u obu pokoleń [98]. Sugeruje to uniwersalność mechanizmów regulujących utrzymanie stanu merystematycznego zarówno w pokoleniu haploidalnym jak i diploidalnym.

DETERMINACJA PŁCI

Gametofity *C. richardii* są pokoleniem wolnożyjącym, o wyraźnym dymorfizmie płciowym, dlatego też były intensywnie wykorzystywane do rozszyfrowania molekularnego mechanizmu determinacji płci u roślin. Dojrzały sporofit produkuje jednakowe zarodniki, które mogą tworzyć gametofity dowolnej płci, co sugeruje, że determinacja płci jest niezależna od genotypu natomiast podlega kontroli środowiskowej [54]. Związkiem odpowiedzialnym za determinację ścieżki rozwojowej osobnika jest hormon zwany anterydiogenem (A_{CE}). Jest on syntetyzowany i wydzielany przez gametofity hermafrodytyczne, które rozwinęły się w populacji jako pierwsze. Zarodniki, które kiełkują nieco później, ze względu na obecność anterydiogenu w podłożu rozwijają się jako gametofity męskie, a przy ciągłej obecności hormonu ich płeć zostaje nieodwracalnie zdeterminowana. Równocześnie u osobników hermafrodytycznych komórki tworzące strefę merystematyczną są niewrażliwe na działanie A_{CE} , dlatego też w tej części plechy nie tworzą się gametangia męskie, natomiast mogą się one tworzyć poza tą strefą [2, 10, 58, 78]. Gęstość kiełkujących zarodników decyduje o stosunku osobników hermafrodytycznych do męskich ze względu na stężenie hormonu w środowisku [58]. Anterydiogen spowalnia również wzrost męskich i hermafrodytycznych gametofitów typu dzikiego oraz męskich osobników mutantu *him1* (*highly male1*); mutant ten charakteryzuje się rozwojem męskich gametofitów niezależnie od obecności hormonu [36].

Analiza fenotypów pojedynczych, podwójnych i potrójnych mutantów pozwoliła na ustalenie sieci wzajemnych oddziaływań i poznanie mechanizmu determinacji płci (Tab. 1), jak również na opracowanie modelu szlaku prowadzącego do wyboru płci (Ryc. 2) [9, 87]. Model ten opiera się na interakcjach dwóch klas

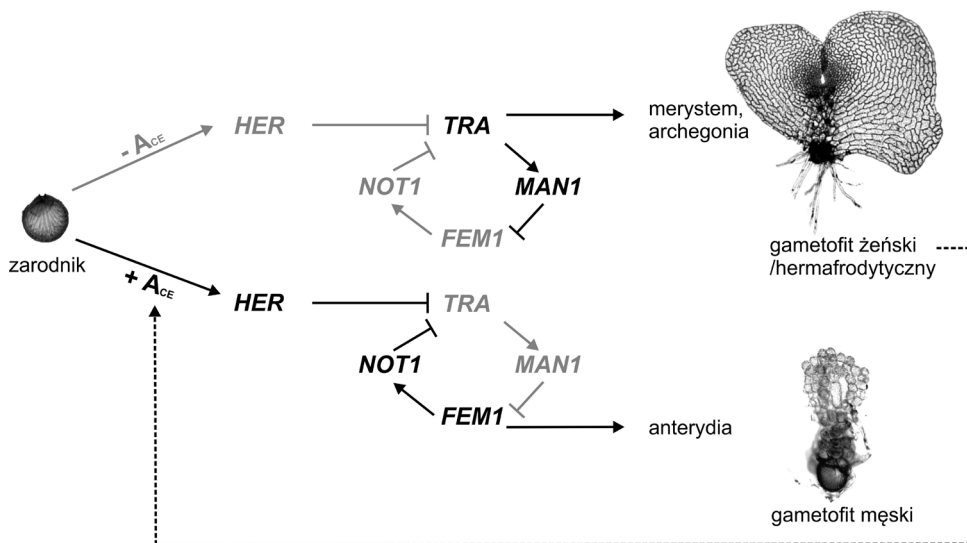
genów: *FEMINIZATION (FEMI)*, determinujących rozwój gametofitów męskich oraz *TRANSFORMER (TRA)* determinujących rozwój gametofitów żeńskich. W pojedynczym osobniku tylko jedna z wymienionych klas genów ulega ekspresji ze względu na ich wzajemnie antagonistyczne oddziaływanie [6, 7, 8, 10, 30]. Gen *TRA* reguluje pozytywnie inny gen, *MANY-ANTHERIDIAL (MANI)*, który bezpośrednio hamuje aktywność genu *FEMI* [8]. Natomiast gen *FEMI* wpływa na ekspresję genu *NOTCHLESS1 (NOTI)*, który bezpośrednio hamuje ekspresję *TRA* [85, 87]. Za regulację aktywności tych dwóch klas genów odpowiada anterydiogen, który indukuje ekspresję genu *HERMAPHRODITIC (HER)*. Tak więc, kiedy w środowisku występuje anterydiogen, geny *HER* zostają aktywowane hamując geny *TRA*, możliwa jest wtedy ekspresja genu *FEMI* i rozwój osobnika męskiego.

TABELA 1. Główne klasy mutantów płci gametofitów *C. richardii* [87]
TABLE 1. Main classes of sex mutants of *C. richardii* gametophytes [87]

NAZWA MUTANTA	FENOTYP MUTANTA
<i>her (hermaphroditic)</i>	rozwija się zawsze jako osobnik hermafrodytyczny, niezależnie od obecności A_{CE}
<i>tra (transformer)</i>	rozwija się zawsze jako osobnik męski, niezależnie od obecności A_{CE} w środowisku
<i>fem (feminization)</i>	rozwija się zawsze jako osobnik żeński
<i>man (many antheridia)</i>	w obecności A_{CE} rozwija się jako osobnik męski, natomiast przy braku A_{CE} jako osobnik hermafrodytyczny, ale wytwarzający dziesięciokrotnie większą liczbę anterydiów niż osobnik typu dzikiego
<i>not (notchless)</i>	charakteryzuje się zmniejszoną liczbą anterydiów i zaburzonym funkcjonowaniem merystemu brzeżnego, związanym z brakiem wgłębienia lokalizującego merystem

Natomiast brak anterydiogenu umożliwia ekspresję genów *TRA* i w związku z tym hamowanie genu *FEMI*, co skutkuje rozwojem osobnika o cechach żeńskich [6, 7, 8, 9, 10, 85]. Jest to przykład epigenetycznego mechanizmu odpowiedzialnego za determinację płci osobnika (Ryc. 2). Oprócz wymienionych wyżej genów wykazano też inne, które są zależne od A_{CE} , np. pokazano, że gen *ANII (ANTHERIDIOGEN-INDUCED 1)* ulega przejściowej ekspresji w trakcie rozwoju osobnika męskiego [96]. GANGER i współaut. [34] potwierdzili rolę *ANII* w procesie determinacji płci, sugerując jednocześnie udział tego genu podczas całego rozwoju gametofitu męskiego. Wydaje się jednak, że ze względu na wysoki poziom ekspresji *ANII* w gametofitach hermafrodytycznych, gen ten może być zaangażowany nie tylko w rozwój osobników męskich [34]. Niedawno Atallah i współaut.

[3] opisali transkryptom *C. richardii* w trakcie determinacji płci gametofitu pod wpływem anterydiogenu, wskazując na istotne różnice w profilach ekspresji genów pomiędzy osobnikami męskimi a hermafrodytycznymi. Większość z genów zaangażowanych w rozwój osobnika i odpowiedź hormonalną wykazywała wyższą odpowiedź w gametofitach męskich, co jest związane bezpośrednio z działaniem A_{CE} . Zidentyfikowano również geny biorące udział w przebudowie chromatyny i epigenetycznej regulacji determinacji płci [3].



RYCINA 2. Schemat prezentujący mechanizm determinacji płci u *Ceratopteris richardii* uwzględniający potencjalne interakcje pomiędzy genami w obecności (+) i przy braku (-) hormonu – anterydiogenu (A_{CE}) w środowisku. Szczegółowy opis zamieszczony w tekście. Nazwy zaznaczone na czarno – na włączone geny, które są włączone w trakcie determinacji danej płci, natomiast zaznaczone na szaro – na wyłączone geny. Strzałki oznaczają promowanie aktywności danego genu, linie zakończone płasko jego tłumienie. Przerywana linia wskazuje na sugerowane w literaturze źródło A_{CE} w środowisku. *HER* (*HERMAPHRODITIC*), *TRA* (*TRANSFORMER*), *FEM1* (*FEMINIZATION*), *NOT1* (*NOTCHLESS1*), *MAN1* (*MANY-ANTHERIDIA1*)

FIGURE 2. A diagram showing the mechanism of sex determination in *Ceratopteris richardii* with potential interactions between genes in the presence (+) and absence (-) of hormone, antheridiogen (A_{CE}). Detailed description included in the text. Names in black indicate genes that are switched on during the determination of the sex, while marked in gray show genes that are switched off. The activity of the gene is shown by the arrows – suppression of the gene activity is shown by the flat-ended lines. A dashed line indicates the potential A_{CE} source in the environment. *HER* (*HERMAPHRODITIC*), *TRA* (*TRANSFORMER*), *FEM1* (*FEMINIZATION*), *NOT1* (*NOTCHLESS1*), *MAN1* (*MANY-ANTHERIDIA1*)

Mimo zdeterminowania płci na wczesnym etapie rozwoju, gametofity męskie zachowują możliwość zmiany ścieżki rozwoju, jeśli zostaną uwolnione spod wpływu anterydiogenu i mają zachowane jeszcze komórki niezróżnicowane w anterydia. U takich osobników jedna z niezróżnicowanych komórek plechy zaczyna się dzielić, tworząc sercowaty hermafrodytyczny gametofit, z funkcjonującym merystemem i gametangiami. Im dłużej męskie gametofity są ekspozowane na działanie anterydiogenu, tym mniejszy procent osobników może jednak ulec takiej konwersji [2, 22, własne obserwacje].

Oprócz badania wpływu podstawowego hormonu – anterydiogenu na determinację płci u *C. richardii* testowano także rolę innych znanych hormonów w tym procesie; wyniki tych badań zostały przedstawione w rozdziale Hormony.

Dodatkowym czynnikiem, modyfikującym wrażliwość gametofitów na anterydiogen, jest światło [55]. Światło niebieskie, które u osobników typu dzikiego nie zmienia odpowiedzi na anterydiogen, u mutantów *her1* w obecności hormonu promuje rozwój gametofitów męskich. Natomiast światło czerwone działa antagonistycznie do niebieskiego: jednoczesne traktowanie mutantu *her1* światłem niebieskim i czerwonym ogranicza tworzenie osobników męskich [55].

Sprawdzono również, jaki wpływ na rozwój gametofitów *C. richardii* ma zróżnicowany poziom dostępnych składników odżywczych. Zakładano, że przy ograniczonym dostępie składników odżywczych promowany będzie rozwój osobników męskich, gdyż nakłady energetyczne potrzebne do ich rozwoju są mniejsze niż w przypadku osobników hermafrodytycznych. Badania pokazały jednak, że poziom dostępnych składników odżywczych nie decyduje o indukcji męskich gametofitów [4] i że nie ma zależności pomiędzy zawartością makroelementów, takich jak węgiel, azot i fosfor, których zmniejszona dostępność w podłożu zwykle wpływa ograniczająco na wzrost roślin, a plastycznością płci osobnika [37, 38, 39]. Osobniki hermafrodytyczne odznaczały się wyższą zawartością azotu i niższą zawartością węgla w porównaniu z osobnikami męskimi, co można tłumaczyć zwiększonym zapotrzebowaniem wciąż rosnącego gametofitu hermafrodytycznego [37]. Dodatkowo gametofity hermafrodytyczne na pożywkach ze zmniejszoną zawartością azotu i węgla miały zredukowany rozmiar, inwestując prawdopodobnie niewielkie zasoby pierwiastków w wytworzenie funkcjonalnych struktur rozrodczych [38].

Badania pokazały również, że wielkość zarodnika nie jest skorelowana z płcią tworzącego się osobnika, natomiast wpływa na rozmiar powstającego gametofitu [36].

W ostatnim czasie sugerowano także wpływ bakterii glebowej, *Pseudomonas nitroreducens*, na determinację płci i rozwój gametofitów *C. richardii*. Dodanie tej bakterii do hodowli gametofitów powodowało zredukowanie liczby osobników męskich w populacji oraz zwiększony wzrost plechy, a także wydłużenie ryzoidów i zmniejszenie ich liczby u obu płci. Badania te podkreślają złożoność interakcji pomiędzy gametofitem a jego środowiskiem, w tym obecnością bakterii glebowych [35].

HORMONY

Istotnymi czynnikami regulującymi wzrost i rozwój roślin są hormony, dlatego też ich wpływ był szeroko badany u *C. richardii*.

Jednym z ważniejszych hormonów jest auksyna. Jej wpływ analizowano dodając do hodowli gametofitów syntetyczne auksyny, kwas naftylo-1-octowy (NAA) i kwas 2,4,5-trichlorofenoksyoctowy (2,4,5-T), oraz związki zaburzające prawidłowe działanie i transport auksyny, takie jak kwas 2-(p-chlorofenoksy) izobutyloowy (PCIB), kwas trijodobenzoesowy (TIBA) i kwas naftyloftalamowy (NPA) [40]. Egzogenna auksyna hamowała aktywację merystemu brzeżnego oraz tworzenie gametangiów, a powstałe osobniki przypominały wielkością i kształtem gametofity męskie. Strefa inicjacji nowych ryzoidów oprócz części bazalnej obejmowała również części marginalne gametofitu [40, 83]. W przypadku zastosowania PCIB gametofity przybierały kolisty kształt, bez widocznego funkcjonującego merystemu, TIBA wywoływał natomiast opóźnioną w stosunku do kontroli aktywację merystemu, a przy traktowaniu NPA pojawiał się drugi merystem brzeżny, powodując zróżnicowanie kształtów gametofitów. Na podstawie analizy fenotypu gametofitów rosnących na pożywkach suplementowanych syntetyczną auksyną lub inhibitorami opracowano hipotetyczny model auksynowej regulacji powstawania merystemu brzeżnego i jego aktywności w trakcie rozwoju gametofitu *C. richardii*. Model ten zakłada, że początkowo merystem apikalny odpowiada za produkcję auksyny, która jest transportowana ku bazalnej części gametofitu, hamując aktywność merystemów. Następnie merystem apikalny traci aktywność, a jego funkcję losowo przejmuje jeden z merystemów brzeżnych. Potwierdzenie tego modelu wymaga jednak dalszych badań [40]. W stadium sporofitu wykazano hamujący wpływ egzogennej auksyny (kwas indolilo-3-octowy/IAA oraz kwas indolilo-3-masłowy/IBA) na wzrost korzenia głównego i korzeni bocznych, natomiast nie odnotowano jej wpływu na inicjację nowych korzeni bocznych. Traktowanie sporofitu NPA dało podobny efekt, jak w przypadku auksyny. Wyniki te sugerują, że u *C. richardii* egzogennie stosowana auksyna nie stymuluje wzrostu korzeni i nie indukuje tworzenia korzeni bocznych. Może być to związane z istnieniem odmiennego mechanizmu kontrolującego rozwój korzeni bocznych u roślin zarodnikowych (w tym paproci) niż u młodszych ewolucyjnie roślin nasiennych [52].

Oprócz auksyny ważną rolę w utrzymaniu aktywności merystemu brzeżnego gametofitów może pełnić drugi hormon – kwas abscysynowy (ABA), który prawdopodobnie jest produkowany przez region merystematyczny i transportowany w obrębie plechy. Podawany egzogennie ABA działa antagonistycznie do A_{CE} , uniemożliwiając tym samym rozwój męskich gametofitów w populacji oraz powstawanie anterydiów na gametofitach hermafrodytycznych. W efekcie tworzą się wyłącznie osobniki żeńskie, u których obecny jest merystem oraz archego-

nia [41]. Natomiast mutanty *abr*, niewrażliwe na ABA, w obecności anterydiogenu tworzą „super męskie” gametofity, charakteryzujące się zwiększoną liczbą powstających anterydiów [10, 30, 42]. Wyniki te spowodowały, że ABA został zaproponowany jako specyficzny inhibitor blokujący aktywność A_{CE} , a tym samym czynnik związany z ochroną regionu merystematycznego u osobników hermafrodytycznych [10, 41, 94]. Niewrażliwość na ABA jest związana z uszkodzeniem genu *GAMETOPHYTE INSENSITIVE TO ABA 1 (GAI1)* i powoduje, że u mutantów *C. richardii* wszystkie gametofity rozwijają się jako męskie, niezależnie od obecności A_{CE} lub ABA w pożywce [66]. W związku z tym zaproponowano poszerzenie modelu determinacji płci o ABA i gen *GAI1*. ABA aktywuje ekspresję genu *GAI1*, który tłumia działanie anterydiogenu i genów *HER* oraz indukuje geny *TRA*. Mechanizm ten nie jest jednak jeszcze do końca poznany [86]. Znaczenie ABA było również sprawdzane w kontekście przejścia gametofitu męskiego w hermafrodytyczny w wyniku zniesienia działania A_{CE} . Gametofity męskie wystawione na obecność egzogenego ABA nie wykazywały przyspieszonej konwersji w osobniki hermafrodytyczne, a co więcej wysokie stężenie tego hormonu ($>100 \mu\text{M/L}$) blokowało zmianę, prowadząc częściej do starzenia się męskich osobników [34].

Wpływ i znaczenie anterydiogenu dla rozwoju gametofitów *C. richardii* zostały opisane w rozdziale poświęconym determinacji płci. Natomiast warto zwrócić tutaj uwagę na sam charakter tego związku. Pomimo iż u większości paproci anterydiogeny są klasyfikowane jako gibereliny, w przypadku *C. richardii* związek ten nie został nadal zidentyfikowany. Aktywność biologiczna i natura chemiczna A_{CE} oraz wrażliwość na inhibitory syntezy giberelin (ancymidol, AMO-1618 i unikonazol-P) sugerują przynależność tego specyficznego gatunkowo związku do grupy giberelin [9, 58, 93]. Wskazuje na to również analiza transkryptomu gametofitów, która wykazała, że w gametofitach hermafrodytycznych, produkujących A_{CE} , występuje zwiększona ekspresja genu *COPALYL DIPHOSPHATE SYNTHASE/KAURENE SYNTHASE (CPS/KS)* odpowiedzialnego za kodowanie enzymu kluczowego dla biosyntezy giberelin [3].

Na rozwój gametofitu *C. richardii* mają również wpływ cytokiny [82]. Wykorzystane w analizach 6-benzylaminopuryna, kinetyna i 2-izopentyladenina już przy niewielkim stężeniu (10^{-12} M) indukowały zmiany morfologii rosnących w ciemności gametofitów. U osobników traktowanych hormonem następowało zmniejszenie długości i poszerzenie plechy w wyniku częstszych podziałów peryklinalnych oraz przesunięcie strefy indukcji ryzoidów do części subapikalnej gametofitu. Przy wyższych stężeniach hormonu (10^{-9} - 10^{-8} M) pojawiało się wgłębienie merystemu brzeżnego, charakterystyczne dla gametofitów hermafrodytycznych rozwijających się w obecności światła. Wyniki te sugerują, że cytokiny mogą zastąpić bodziec fotomorfo-genetyczny, jakim jest zmiana długości światła,

decydując o kierunku podziałów komórkowych, elongacji oraz różnicowaniu się komórek. Cytokiny nie indukują jednak kiełkowania zarodników w ciemności, nie stwierdzono również ich wpływu na syntezę chlorofilu. W przypadku gametofitów rosnących w świetle białym nie zaobserwowano znaczących zmian po traktowaniu cytokininami [82].

FOTOMORFOGENEZA

Zarodniki paproci stanowią dogodny system eksperymentalny do badań procesu fotomorfogenezы. Analizy wykazały, że do kiełkowania zarodników *C. richardii*, podobnie jak u wielu innych paproci, wymagana jest ich ekspozycja na światło białe lub czerwone. W ciemności lub w świetle niebieskim zarodniki nie kiełkują, natomiast daleka czerwień odwraca efekt światła czerwonego [26]. Zidentyfikowano kilka klas mutantów związanych z fotomorfogenezą, jednak najlepiej poznanym i scharakteryzowanym jest mutant *dark germinating 1 (dkg1)*, który kiełkuje wyłącznie w ciemności [25, 56, 80]. Mutant *dkg1* tworzy wydłużoną, paskowatą plechę, na szczycie której formuje się merystem brzeżny wraz z archegoniami i anterydiami, co odróżnia mutanta od gametofitu typu dzikiego, rozwijającego się w obecności światła białego [25, 55, 56]. Natomiast osobniki typu dzikiego, rosnące w ciemności, mają fenotyp podobny do mutantu *dkg1*: tworzą wydłużoną plechę w kształcie paska, w obrębie której można wyróżnić trzy strefy – merystem apikalny, strefę pod merystemem charakteryzującą się wydłużaniem komórek oraz strefę bazalną, w obrębie której nie obserwuje się wzrostu. Zachowanie komórek gametofitu w poszczególnych strefach warunkowane jest światłem o różnej długości. Czynnikiem decydującym o elongacji komórek jest światło niebieskie, które powoduje reorientację mikrotubul kortykalnych i wpływa na wzrost komórek. Każda z komórek należących do strefy elongacji odbiera od otoczenia sygnał niezależnie od pozostałych [67]. Światło białe i czerwone indukują asymetryczny podział komórek marginalnych położonych w strefie elongacji, a mniejsze komórki powstałe w wyniku tego podziału rozwijają się w ryzoidy. Dalszy wzrost ryzoidu jest już związany z ciągłą ekspozycją na światło białe, czerwone lub niebieskie [68].

REAKCJA GRAWITROPIJNA

Jednokomórkowe zarodniki *C. richardii* ze względu na duży rozmiar (średnica 150-300 μm) oraz początkowo prostą budowę rozwijających się z nich gametofitów okazały się dobrym modelem do badania komórkowych mechanizmów percepcji grawitacji [18, 77]. Pierwsze badania dotyczyły wpływu grawitacji na

kierunek wzrostu ryzoidów. W warunkach standardowych ponad 90% ryzoidów rośnie zgodnie z przyciąganiem ziemskim. Kiełkowanie zarodników w klinostacie, przy ciągłej zmianie orientacji, powoduje, że ryzoidy nie wykazują preferencji w kierunku wzrostu. Co ciekawe, reorientacja kiełkującego zarodnika wpływa na zmianę kierunku wzrostu ryzoidów tylko przez krótki okres czasu, ograniczony do pierwszych 5 godzin po rozpoczęciu kiełkowania. Po tym czasie ryzoidy, również te nowo powstałe, rosną w ustalonym początkowo kierunku. Wyznaczono na tej podstawie okno czasowe, w którym dochodzi do nieodwracalnej determinacji polarności ryzoidu przez grawitację, odzwierciedlonej w migracji jądra komórkowego i kierunku wzrostu ryzoidów [32]. Kolejne badania skupiły się na wpływie grawitacji na ustalenie polarności zarodnika oraz opisanie fizjologicznego podłoża tego procesu [21, 31]. Nieodwracalne ustanowienie dwóch biegunów w rozwoju zarodnika pod wpływem siły grawitacji następuje w ciągu pierwszych 18-24 godzin kiełkowania. Po około 48 godzinach ekspozycji na światło dochodzi do asymetrycznego podziału, wyznaczającego mniejszą komórkę tworzącą pierwszy ryzoid oraz większą komórkę, rozwijającą się w plechę gametofitu. Światło białe stanowi tutaj drugorzędny czynnik po grawitacji i tylko w niewielkim stopniu wpływa na polarność zarodnika [31]. Ustalenie polarności zarodnika związane jest ze specyficznym ruchem jonów wapnia, który jest przeciwny do wektora grawitacji: jony wapnia wypływają w górnej części zarodnika, natomiast wpływają u dołu. Zastosowanie nifedypiny, związku blokującego kanały wapniowe, powoduje utratę wrażliwości komórki na działanie grawitacji, zaburzając jej polaryzację [21]. Rotacja zarodnika o 180° szybko powoduje ponowne ustanowienie kierunku przepływu jonów Ca^{2+} względem nowego wektora grawitacji [77, 88], prawdopodobnie w wyniku miejscowych zmian aktywności kanałów i pomp wapniowych, rozmieszczonych w błonie komórkowej zarodnika [77]. Wykazano, że błonowe Ca^{2+} -ATPazy nie uczestniczą w ustalaniu polarności zarodnika, biorą jednak udział w szczytowym wroście ryzoidu [16, 17]. Na wyznaczenie polarności mają wpływ Ca^{2+} -ATPazy charakterystyczne dla retikulum endoplazmatycznego [77], co zostało potwierdzone wysokim poziomem transkryptów w 10 godzinie kiełkowania zarodnika [15]. *C. richardii* jest również wykorzystywany jako jeden z roślinnych gatunków modelowych do badań w środowisku mikrogravitacji. Między innymi posłużył do porównania mechanizmu migracji jądra komórkowego oraz ekspresji genów na wczesnym etapie kiełkowania zarodnika w warunkach mikrogravitacji (lotu kosmicznego) i w warunkach normalnego rozwoju (ziemska grawitacja) [18, 74, 77]. Proponowanym grawisensorem w gametoficie *C. richardii* są chloroplasty zakotwiczone wzdłuż błony komórkowej [57]. Hipotezę tę zweryfikowano analizując mutanty *clumped chloroplast 1 (cpl)*, których chloroplasty nie mogą się przemieszczać i akumulują się w postaci grud wokół jądra komórkowego. Gametofity *cpl* rosnące w ciemności wykazują grawitropizm ujemny, który tylko w niewielkim stopniu jest hamowany przez reorientację

chloroplastów [57]. Warto podkreślić, że jest to propozycja odmiennego systemu odpowiedzi grawitropijnej niż u roślin nasiennych, w którym w percepcję bodźca zaangażowany jest inny typ plastydów niż amyloplasty. System ten wymaga jednak dalszych badań.

STRES ŚRODOWISKOWY I CHEMICZNY

Modelowy gatunek posłużył również do poszukiwania mechanizmów odporności roślin na szkodliwe związki hamujące ich wzrost i rozwój. Jednym z głównych czynników powodujących słaby wzrost roślin na kwaśnych glebach jest toksyczność glinu. Badania prowadzone w tym kierunku na gametofitach *C. richardii* pozwoliły na selekcję trzech mutantów (H α AT3, H α AT7, H α AT29) wykazujących tolerancję na dostępność kationów glinu w podłożu o pH 4,4 [97]. Innym istotnym czynnikiem, hamującym wzrost roślin, jest zasolenie gleb. U *C. richardii* wyselekcjonowano mutanty (*stl1* i *stl2*), u których procent skiełkowanych zarodników był wyższy niż u typu dzikiego a gametofity osiągały większe rozmiary w warunkach zasolenia. Co ciekawe, gametofit mutantów odznaczał się większą tolerancją na wysoki poziom zasolenia podłoża od sporofitu [48, 91, 92, 95]. Wyselekcjonowano również mutanty *C. richardii*, charakteryzujące się tolerancją na różnego rodzaju herbicydy, m.in. na parakwat (dichlorek 1,1'-dimetylo-4,4'-bipirydyniowy) [19, 43, 44], glifosat czy acifluorfen. Powyższe przykłady ukazują przydatność modelowej paproci w badaniach podstawowych mechanizmów zaangażowanych w odpowiedź organizmów roślinnych na pojawiający się w środowisku czynnik stresowy, zwiększających tolerancję na związki ograniczające ich przeżywalność i wzrost, a które mogą być wykorzystane w procesie ulepszania roślin uprawnych.

ŚCIANA KOMÓRKOWA

Ściana komórkowa pełni u roślin wiele istotnych funkcji, odgrywając często kluczową rolę w pojawiających się ewolucyjnych innowacjach budowy organizmu roślinnego [5]. Dlatego też prowadzi się badania składu ściany komórkowej u paproci, jako starej filogenetycznie i ważnej ewolucyjnie grupy, umożliwiając tym samym analizy porównawcze w stosunku do roślin nasiennych. Dodatkowo u paproci możliwe jest porównanie zmian w składzie ściany komórkowej pomiędzy pokoleniem diploidalnym a haploidalnym [33, 59]. Wykorzystując metodę immunolokalizacji komponentów ściany ustalono, że zarówno w tkankach gametofitu jak i sporofitu typowymi składnikami są związki takie jak homogalakturnan, mannan i ksyloglukan. W sporoficie ze względu na obecność zróżnicowa-

nych tkanek wykryto dodatkowo ksylany, obecne we wtórnych ścianach komórek ksylemu oraz galaktan, obecny wyłącznie w komórkach floemu. W przypadku ryzoidów gametofitów i włośników korzeni wykazano obecność arabinogalaktanu (AGP) oraz ksyloglukanu. Analizy biochemiczne wykazały, że skład ściany komórkowej paproci jest podobny do składu ściany roślin okrytonasiennych [33, 59]. Szczegółowe badania dostarczyły dowodów na zaangażowanie AGP w prawidłowy rozwój gamet u paproci. Arabinogalaktany oraz (1,5)- α -L-arabinan są głównymi komponentami wewnętrznej warstwy ściany komórki jajowej, zaangażowanymi w proces dojrzewania, zapłodnienia oraz wczesnej embriogenezy [62]. Znacznie bardziej skomplikowana jest struktura ściany komórkowej powstającej w procesie spermatogenezy, która rozdziela najpierw rozwijające się, a następnie dojrzałe gamety męskie. Opisano powstawanie pięciu ścian, które zbudowane są z różnych polisacharydów: 1) kalozy oraz ksylanów, 2) celulozy oraz ksylanów, 3) wyłącznie z kalozy, 4) celulozy usieciowanej przez galaktoksyloglukan, oraz 5) z arabinogalaktanu. Każda ze ścian pełni odmienną funkcję w trakcie dojrzewania męskich gamet [63]. Obecność AGP jest także niezbędna do powstawania i prawidłowego rozwoju wici spermatozoidów [61].

APOGAMIA I AOSPORIA

Modelowa paproć *Ceratopteris richardii* znajduje również zastosowanie w badaniu procesów apogamii i aposporii [13, 14, 28]. Został opracowany specjalny system eksperymentalny umożliwiający indukcję apogamii, czyli pozyskiwanie haploidalnego sporofitu z komórek gametofitu [28]. Polega on na hodowli gametofitów na pożywkach z wysoką zawartością cukru (2,5% glukoza/sacharoza), przy jednoczesnym zapobieganiu procesowi zapłodnienia. W tym celu wykorzystywane są różne sposoby, jak fizyczne usuwanie osobników męskich z populacji, odwracanie szalki Petriego, aby zminimalizować dostępność wody, czy stosowanie mutantów *her1*, które nie tworzą gametofitów męskich lub *fem1*, które rozwijają się jako osobniki żeńskie [27]. Hodowla na optymalnym podłożu sprawia, że gametofity proliferują, zwiększa się liczba ryzoidów, a anterydia tworzą się w grupach w brzeżnych częściach plechy. Po 25-30 dniach na gametoficie zaczynają pojawiać się wyrostki, które przypominają struktury sporofitu i mogą przyjmować kształt liści, łodyg, a nawet korzeni. Charakteryzują się trójwymiarową strukturą, obecnością tkanki przewodzącej oraz aparatów szparkowych, czyli cechami charakterystycznymi dla sporofitu. Zawartość DNA oraz liczba chromosomów pozostaje jednak na poziomie haploidalnym, co potwierdza, że są to sporofity powstałe w procesie apogamii. Takie haploidalne sporofity nie dojrzewają i nie są w stanie wytwarzać zarodników. Co ciekawe, w puli game-

tofitów hodowanych w warunkach standardowych również dochodzi do powstawania pojedynczych apogamicznych sporofitów, pokazując, jak plastyczny jest rozwój *C. richardii* [27]. Do badania mechanizmu apogamii na poziomie molekularnym wykorzystano metodę transformacji przy użyciu *Agrobacterium* [12, 14]. Pokazano, że ektopowa ekspresja genów promujących proces apogamii, *CrANT* (*AINTEGUMENTA*) lub *BnBBM* (*BABY BOOM*) indukuje spontaniczne tworzenie apogamicznych sporofitów. Natomiast wyciszenie ekspresji *CrANT* zmniejsza liczbę tworzących się osobników w indukowanej cukrem apogamii [14]. Wyniki te wskazują na uniwersalność genów *CrANT* i *BBM* w promowaniu tworzenia nowych sporofitów bez procesu zapłodnienia u roślin naczyniowych.

Drugim procesem modyfikującym cykl życiowy jest aposporia, w wyniku której z wegetatywnych tkanek sporofitu tworzy się diploidalny gametofit, zachowujący zdolność do rozmnażania generatywnego. Indukowana aposporia jest więc stosowana do produkcji poliploidalnych osobników, wykorzystywanych następnie do analiz genetycznych [29]. Aposporię u *C. richardii* można zaindukować hodując odcięte liście sporofitu na pożywce z dodatkiem 0,01% [27] lub 0,5% [13] sacharozy/glukozy. Po około 49 dniach tworzą się diploidalne gametofity zdolne do rozmnażania [27]. Oprócz procesu aposporii dochodzi także do regeneracji sporofitu, zwłaszcza przy wysokim stężeniu cukru (2,5% sacharoza/glukoza) [13].

Testowano również wpływ jednego z hormonów – etylenu, na proces aposporii i regenerację *C. richardii* [13]. Aby zwiększyć poziom etylenu wewnątrz komórek roślinnych stosowano etefon (kwas 2-chloroetylofosfonowy), natomiast jako inhibitor używano tiosiarczanu srebra (STS). Badania wykazały, że etylen wpływa na zwiększenie liczby eksplantantów zaangażowanych w regenerację i aposporię, jak również na całkowitą liczbę powstałych po regeneracji sporofitów i aposporycznych gametofitów. Jednak zbyt wysokie stężenie etefonu (100 mg/L) jak i stosowanie STS (20 μ M) działają hamująco na proces aposporii i regeneracji [13].

PODSUMOWANIE

Ceratopteris richardii, należąca do paproci cienkozarodniowych, jest gatunkiem modelowym szeroko wykorzystywanym do badań różnorodnych procesów rozwojowych i komórkowych. Jedną z kluczowych zalet *Ceratopteris* jest obecność dwóch niezależnych i wolnożyjących pokoleń umożliwiających analizę i porównanie mechanizmów regulatorowych w osobniku diploidalnym i haploidalnym. Ponadto *C. richardii* stanowi prosty i łatwy system eksperymentalny, oferujący badaczowi szeroki zakres możliwości. Pomimo dużego rozmiaru genomu, który nie został jeszcze całkowicie zsekwencjonowany, dostępna jest już w bazach spora liczba sekwencji. Opracowanie stabilnych metod transformacji

genetycznej *C. richardii* umożliwiają dodatkowo analizy funkcjonalności wybranych genów. Dalsze badania z wykorzystaniem tego gatunku pozwolą na poznanie mechanizmów regulacji procesów na poziomie genetycznym, komórkowym i organizmalnym, a ze względu na pozycję filogenetyczną paproci także na uzyskanie odpowiedzi na ważne pytania dotyczące ewolucji i rozwoju roślin lądowych.

PODZIĘKOWANIA

Chciałbym podziękować dr hab. Edycie Goli za merytoryczną dyskusję oraz cenne uwagi pomocne w przygotowaniu niniejszego artykułu.

Artykuł finansowany przez Uniwersytet Wrocławski, Subwencja 2020 – Działalność badawcza (501) – Nauki biologiczne (73).

LITERATURA

- [1] ALONGI DA, HILL JP, GERMINO MJ. Opportunistic heterotrophy in gametophytes of the homosporous fern *Ceratopteris richardii*. *Botany* 2009; **87**: 799-806.
- [2] ATALLAH N, BANKS JA. Reproduction and the pheromonal regulation of sex type in fern gametophytes. *Front Plant Sci* 2015; **6**: 100.
- [3] ATALLAH NM, VITEK O, GAITI F, TANURDZIC M, BANKS JA. Sex determination in *Ceratopteris richardii* is accompanied by transcriptome changes that drive epigenetic reprogramming of the young gametophyte. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 2018; **8**: 2205-2214.
- [4] AYRAPETOV A, GANGER MT. Nutrient levels do not affect male gametophyte induction by antheridiogen in *Ceratopteris richardii*. *Am Fern J* 2009; **99**: 273-278.
- [5] BANASIAK A. Evolution of the cell wall components during terrestrialization. *Acta Soc Bot Pol* 2014; **83**: 349-362.
- [6] BANKS JA. Sex-determining genes in the homosporous fern *Ceratopteris*. *Development* 1994; **120**: 1949-1958.
- [7] BANKS JA. Sex determination in the fern *Ceratopteris*. *Trends Plant Sci* 1997; **2**: 175-180.
- [8] BANKS JA. The TRANSFORMER genes of the fern *Ceratopteris* simultaneously promote meristem and archegonia development and repress antheridia development in the developing gametophyte. *Genetics* 1997; **147**: 1885-1897.
- [9] BANKS JA. Gametophyte development in ferns. *Annu Rev Plant Biol* 1999; **50**: 163-186.
- [10] BANKS JA, HICKOK L, WEBB MA. The programming of sexual phenotype in the homosporous fern *Ceratopteris richardii*. *Int J Plant Sci* 1993; **154**: 522-534.
- [11] BARTZ M, GOLA EM. Meristem development and activity in gametophytes of the model fern, *Ceratopteris richardii*. *Dev Biol* 2018; **444**: 107-115.
- [12] BUI LT, CORDLE AR, IRISH EE, CHENG CL. Transient and stable transformation of *Ceratopteris richardii* gametophytes. *BMC Res Notes* 2015; **8**: 214.
- [13] BUI LT, HURST A, IRISH EE, CHENG CL. The effects of sugars and ethylene on apospory and regeneration in *Ceratopteris richardii*. *Am J Plant Sci* 2012; **3**: 953.
- [14] BUI LT, PANDZIC D, YOUNGSTROM CE, WALLACE S, IRISH EE, SZÖVÉNYI P, CHENG CL. A fern *AINTEGUMENTA* gene mirrors *BABY BOOM* in promoting apogamy in *Ceratopteris richardii*. *Plant J* 2017; **90**: 122-132.

- [15] BUSHART TJ, CANNON AE, UL HAQUE A, SAN MIGUEL P, MOSTAJERAN K, CLARK GB, ..., ROUX SJ. RNA-seq analysis identifies potential modulators of gravity response in spores of *Ceratopteris* (Parkeriaceae): Evidence for modulation by calcium pumps and apyrase activity. *Am J Bot* 2013; **100**: 161-174.
- [16] BUSHART TJ, CLARK GB, PORTERFIELD DM, ROUX SJ. Testing the role of Ca²⁺-ATPases in the gravity-directed trans-cell current of calcium in single-celled spores of *Ceratopteris richardii*. *Gravit Space Biol Bull* 2010; **23**: 81-82.
- [17] BUSHART TJ, ROUX SJ. Conserved features of germination and polarized cell growth: A few insights from a pollen-fern spore comparison. *Ann Bot* 2007; **99**: 9-17.
- [18] CANNON AE, SALMI ML, CANTERO A, ROUX SJ. Generation of transgenic spores of the fern *Ceratopteris richardii* to analyze Ca²⁺ transport dynamics during gravity-directed polarization. In Fernández H ed. *Current Advances in Fern Research*. Springer, Cham, 2018; 285-303.
- [19] CARRLL EW, SCHWARZ OJ, HICKOK LG. Biochemical studies of paraquat-tolerant mutants of the fern *Ceratopteris richardii*. *Plant Physiol* 1988; **87**: 651-654.
- [20] CHASAN R. *Ceratopteris*: A model plant for the 90s. *Plant Cell* 1992; **2**: 113-115.
- [21] CHATTERJEE A, PORTERFIELD DM, SMITH PS, ROUX SJ. Gravity-directed calcium current in germinating spores of *Ceratopteris richardii*. *Planta* 2000; **210**: 607-610.
- [22] CHERUIYOT DJ, SCHWARTZ BW. Conversion of male gametophytes to hermaphrodites in the fern *Ceratopteris richardii*. *Bios* 2007; **78**: 58-61.
- [23] CHRISTENHUSZ MJ, BYNG JW. The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa* 2016; **261**: 201-217.
- [24] CONWAY SJ, DI STILIO VS. An ontogenetic framework for functional studies in the model fern *Ceratopteris richardii*. *Dev Biol* 2020; **457**: 20-29.
- [25] COOKE TJ, HICKOK LG, VANDERWOUDE WJ, BANKS JA, SCOTT RJ. Photobiological characterization of a spore germination mutant *dkgl* with reversed photoregulation in the fern *Ceratopteris richardii*. *Photochem Photobiol* 1993; **57**: 1032-1041.
- [26] COOKE TJ, RACUSEN RH, HICKOK LG, WARNE TR. The photocontrol of spore germination in the fern *Ceratopteris richardii*. *Plant Cell Physiol* 1987; **28**: 753-759.
- [27] CORDLE AR, BUI LT, IRISH EE, Cheng CL. Laboratory-induced apogamy and apospory in *Ceratopteris richardii*. In Fernández H, Kumar A, Revilla MA eds. *Working with ferns*. Springer, New York, 2011; 25-36.
- [28] CORDLE AR, IRISH EE, CHENG CL. Apogamy induction in *Ceratopteris richardii*. *Int J Plant Sci* 2007; **168**: 361-369.
- [29] DE YOUNG B, WEBER T, HASS B, BANKS JA. Generating autotetraploid sporophytes and their use in analysing mutations affecting gametophyte development in the fern *Ceratopteris*. *Genetics* 1997; **147**: 809-814.
- [30] EBERLE J, NEMACHECK J, WEN CK, HaASEBE M, BANKS JA. *Ceratopteris*: a model system for studying sex-determining mechanisms in plants. *Int J Plant Sci* 1995; **156**: 359-366.
- [31] EDWARDS ES, ROUX SJ. Influence of gravity and light on the developmental polarity of *Ceratopteris richardii* fern spores. *Planta* 1998; **205**: 553-560.
- [32] EDWARDS ES, ROUX SJ. Limited period of graviresponsiveness in germinating spores of *Ceratopteris richardii*. *Planta* 1994; **195**: 150-152.
- [33] EECKHOUT S, LEROUX O, WILLATS WG, POPPER ZA, VIANE RL. Comparative glycan profiling of *Ceratopteris richardii* 'C-Fern' gametophytes and sporophytes links cell-wall composition to functional specialization. *Ann Bot* 2014; **114**: 1295-1307.
- [34] GANGER MT, GIROUARD JA, SMITH HM, BAHNY BA, EWING SJ. Antheridiogen and abscisic acid affect conversion and *ANII* expression in *Ceratopteris richardii* gametophytes. *Botany* 2015; **93**: 109-116.
- [35] GANGER MT, HILES R, HALLOWELL H, COOPER L, MCALLISTER N, YOUNGDAHL D, ..., EWING SJ. A soil bacterium alters sex determination and rhizoid development in gametophytes of the fern *Ceratopteris richardii*. *AoB PLANTS* 2019; **11**: 1-12.

- [36] GANGER M, STUREY T. Antheridiogen concentration and spore size predict gametophyte size in *Ceratopteris richardii*. *Botany* 2012; **90**: 175-179.
- [37] GOODNOE TT, HILL JP. Absolute and relative content of carbon and nitrogen differ by sex in *Ceratopteris richardii* gametophytes. *Botany* 2016; **94**: 405-410.
- [38] GOODNOE TT, HILL JP. Plasticity of female reproductive resource allocation depends on the presence or absence of prior environmental sex determination in *Ceratopteris richardii*. *Ecol Evol* 2018; **8**: 6133-6143.
- [39] GOODNOE TT, HILL JP, AHO K. Effects of variation in carbon, nitrogen, and phosphorus molarity and stoichiometry on sex determination in the fern *Ceratopteris richardii*. *Botany* 2016; **94**: 249-259.
- [40] GREGORICH M, FISHER R. Auxin regulates lateral meristem activation in developing gametophytes of *Ceratopteris richardii*. *Botany* 2006, **84**: 1520-1530.
- [41] HICKOK LG. Abscisic acid blocks antheridiogen-induced antheridium formation in gametophytes of the fern *Ceratopteris*. *Can J Bot* 1983; **61**: 888-892.
- [42] HICKOK LG. Abscisic acid resistant mutants in the fern *Ceratopteris*: characterization and genetic analysis. *Can J Bot* 1985; **63**: 1582-1585.
- [43] HICKOK LG, SCHWARZ OJ. An in vitro whole plant selection system: paraquat tolerant mutants in the fern *Ceratopteris*. *Theor Appl Genet* 1986; **72**: 302-306.
- [44] HICKOK LG, SCHWARZ OJ. Genetic characterization of a mutation that enhances paraquat tolerance in the fern *Ceratopteris richardii*. *Theor Appl Genet* 1989; **77**: 200-204.
- [45] HICKOK LG, WARNE TR, BAXTER SL, MELEAR CT. Education: Sex and the C-Fern: Not just another life cycle. *Bioscience* 1998; **48**: 1031-1037.
- [46] HICKOK LG, WARNE TR, FRIBOURG RS. The biology of the fern *Ceratopteris* and its use as a model system. *Int J Plant Sci* 1995; **156**: 332-345.
- [47] HICKOK LG, WARNE TR, SLOCUM MK. *Ceratopteris richardii*: applications for experimental plant biology. *Am J Bot* 1987; **74**: 1304-1316.
- [48] HICKOK LG, VOGELIEN DL, WARNE TR. Selection of a mutation conferring high NaCl tolerance to gametophytes of *Ceratopteris*. *Theor Appl Genet* 1991; **81**: 293-300.
- [49] HILL JP. Meristem development at the sporophyll pinna apex in *Ceratopteris richardii*. *Int J Plant Sci* 2002; **163**: 341-351.
- [50] HOU G, HILL JP. Developmental anatomy of the fifth shoot-borne root in young sporophytes of *Ceratopteris richardii*. *Planta* 2004; **219**: 212-220.
- [51] HOU G, HILL JP, BLANCAFLOR EB. Developmental anatomy and auxin response of lateral root formation in *Ceratopteris richardii*. *J Exp Bot* 2004; **55**: 685-693.
- [52] JOHNSON GP, RENZAGLIA KS. Embryology of *Ceratopteris richardii* (Pteridaceae, tribe Ceratopterideae), with emphasis on placental development. *J Plant Res* 2008; **121**: 581-592.
- [53] JUAREZ C, BANKS J. Sex determination in plants. *Curr Opin Plant Biol* 1998; **1**: 68-72.
- [54] KAMACHI H, IWASAWA O, HICKOK LG, NAKAYAMA M, NOGUCHI M, INOUE H. The effects of light on sex determination in gametophytes of the fern *Ceratopteris richardii*. *J Plant Res* 2007; **120**: 629-634.
- [55] KAMACHI H, MATSUNAGA E, NOGUCHI M, INOUE H. Novel mutant phenotypes of a dark-germinating mutant *dkg1* in the fern *Ceratopteris richardii*. *J Plant Res* 2004; **117**: 163-170.
- [56] KAMACHI H, TAMAOKI D, KARAHARA I. Plasma membrane-anchored chloroplasts are necessary for the gravisensing system of *Ceratopteris richardii* prothalli. *J Plant Res* 2017; **130**: 397-405.
- [57] KAŻMIERCZAK A. Determinacja płci u paproci jednakozaodnikowych. *Postępy biologii komórki* 2007; **34**: 103-122.
- [58] LEROUX O, EECKHOUT S, VIANE RL, POPPER ZA. *Ceratopteris richardii* (C-Fern): a model for investigating adaptive modification of vascular plant cell walls. *Front Plant Sci* 2013; **4**:367.
- [59] LLOYD R. Systematics of the genus *Ceratopteris* (Parkeriaceae). I. Sexual and vegetative reproduction in Hawaiian *Ceratopteris thalictroides*. *Am Fern J* 1973; **63**: 12-18.

- [60] LOPEZ RA, RENZAGLIA KS. Multiflagellated sperm cells of *Ceratopteris richardii* are bathed in arabinogalactan proteins throughout development. *Am J Bot* 2014; **101**: 2052-2061.
- [61] LOPEZ RA, RENZAGLIA KS. Arabinogalactan proteins and arabinan pectins abound in the specialized matrices surrounding female gametes of the fern *Ceratopteris richardii*. *Planta* 2016; **24**: 947-957.
- [62] LOPEZ RA, RENZAGLIA KS. The *Ceratopteris* (fern) developing motile gamete walls contain diverse polysaccharides, but not pectin. *Planta* 2018; **247**: 393-404.
- [63] LOPEZ-SMITH RA, RENZAGLIA KS. Sperm cell architecture, insemination, and fertilization in the model fern, *Ceratopteris richardii*. *Sex Plant Reprod* 2008; **21**: 153-167.
- [64] MARCHANT DB, SESSA EB, WOLF PG, HEO K, BARBAZUK WB, SOLTIS PS, SOLTIS DE. The c-fern (*Ceratopteris richardii*) genome: insights into plant genome evolution with the first partial homosporous fern genome assembly. *Sci Rep* 2019; **9**: 1-14.
- [65] MCADAM SA, BRODRIBB TJ, BANKS JA, HEDRICH R, ATALLAH NM, CAI C, ..., GEIGER D. Abscisic acid controlled sex before transpiration in vascular plants. *PNAS* 2016; **113**: 12862-12867.
- [66] MURATA T, KADOTA A, WADA M. Effects of blue light on cell elongation and microtubule orientation in dark-grown gametophytes of *Ceratopteris richardii*. *Plant Cell Physiol* 1997; **38**: 201-209.
- [67] MURATA T, SUGAI M. Photoregulation of asymmetric cell division followed by rhizoid development in the fern *Ceratopteris* prothalli. *Plant Cell Physiol* 2000; **41**: 1313-1320.
- [68] NAKAZATO T, JUNG MK, HOUSWORTH EA, RIESEBERG LH, GASTONY GJ. Genetic map-based analysis of genome structure in the homosporous fern *Ceratopteris richardii*. *Genetics* 2006; **173**: 1585-1597.
- [69] NAKAZATO T, JUNG MK, HOUSWORTH EA, RIESEBERG LH, GASTONY GJ. A genome wide study of reproductive barriers between allopatric populations of a homosporous fern, *Ceratopteris richardii*. *Genetics* 2007; **177**: 1141-1150.
- [70] PLACKETT AR, CONWAY SJ, HAZELTON KDH, RABBINOWITSCH EH, LANGDALE JA, DI STILIO VS. *LEAFY* maintains apical stem cell activity during shoot development in the fern *Ceratopteris richardii*. *eLife* 2018; **7**: e39625.
- [71] PLACKETT AR, DI STILIO VS, LANGDALE JA. Ferns: the missing link in shoot evolution and development. *Front Plant Sci* 2015; **6**: 972.
- [72] PLACKETT AR, HUANG L, SANDERS HL, LANGDALE JA. High-efficiency stable transformation of the model fern species *Ceratopteris richardii* via microparticle bombardment. *Plant Physiol* 2014; **165**: 3-14.
- [73] ROUX SJ, CHATTERJEE A, HILLIER S, CANNON T. Early development of fern gametophytes in microgravity. *Adv Space Res* 2003; **31**: 215-220.
- [74] RUTHERFORD G, TANURDZIC M, HASEBE M, BANKS JA. A systemic gene silencing method suitable for high throughput, reverse genetic analyses of gene function in fern gametophytes. *BMC Plant Biol* 2004; **4**: 6.
- [75] RUTTER M, RAGHAVAN V. DNA synthesis and cell division during spore germination in *Lygodium japonicum*. *Ann Bot* 1978; **42**: 957-965.
- [76] SALMI ML, BUSHART T, ROUX SJ. Cellular, molecular, and genetic changes during the development of *Ceratopteris richardii* gametophytes. In Fernández H, Kumar A, Revilla MA eds. *Working with ferns*. Springer, New York, 2011; 11-24.
- [77] SCHNELLER J. Antheridiogens. In Ranker T and Haufler C eds. *Biology and evolution of ferns and lycophytes*. Cambridge University Press, 2008; 134-158.
- [78] SCHUETTPELZ E, PRYER KM. Evidence for a Cenozoic radiation of ferns in an angiosperm-dominated canopy. *PNAS* 2009; **106**: 11200-11205.
- [79] SCOTT RJ, HICKOK LG. Inheritance and characterization of a dark-germinating, light-inhibited mutant in the fern *Ceratopteris richardii*. *Can J Bot* 1991; **69**: 2616-2619.
- [80] SESSA EB, BANKS JA, BARKER MS, DER JP, DUFFY AM, GRAHAM SW, ..., PRYER KM. Between two fern genomes. *GigaScience* 2014; **3**: 2047-217X.

- [81] SPIRO MD, TORABI B, CORNELL CN. Cytokinins induce photomorphogenic development in dark-grown gametophytes of *Ceratopteris richardii*. *Plant Cell Physiol* 2004; **45**: 1252-1260.
- [82] STILTS CE, FISHER R. Synthesis of plant auxin derivatives and their effects on *Ceratopteris richardii*. *J Chem Educ* 2007; **84**: 999.
- [83] STOUT SC, CLARK GB, ARCHER-EVANS S, ROUX SJ. Rapid and efficient suppression of gene expression in a single-cell model system, *Ceratopteris richardii*. *Plant Physiol* 2003; **131**: 1165-1168.
- [84] STRAIN E, HASS B, BANKS JA. Characterization of mutations that feminize gametophytes of the fern *Ceratopteris*. *Genetics* 2001; **159**: 1271-1281.
- [85] SUSSMILCH FC, ATALLAH NM, BRODRIBB TJ, BANKS JA, MCADAM SA. Abscisic acid (ABA) and key proteins in its perception and signaling pathways are ancient, but their roles have changed through time. *Plant Signal Behav* 2017; **12**: e1365210.
- [86] TANURDZIC M, BANKS JA. Sex-determining mechanisms in land plants. *Plant Cell* 2004; **16**: 61-71.
- [87] UL HAQUE A, ROKKAM M, DE CARLO AR, WERELEY ST, ROUX SJ, IRAZOQUI PP, PORTERFIELD DM. A MEMS fabricated cell electrophysiology biochip for in silico calcium measurements. *Sens Actuators B Chem* 2007; **123**: 391-399.
- [88] VASCO A, MORAN RC, AMBROSE BA. The evolution, morphology, and development of fern leaves. *Front Plant Sci* 2013; **4**: 345.
- [89] VAUGHN KC, HICKOK LG, WARNE TR, FARROW AC. Structural analysis and inheritance of a clumped chloroplast mutant in the fern *Ceratopteris*. *J Hered* 1990; **81**: 146-151.
- [90] VOGELIEN DL, HICKOK LG, AUGER RM, STODOLA AJW, HENDRIX D. Solute analysis and water relations of gametophyte mutants tolerant to NaCl in the fern *Ceratopteris richardii*. *Plant Cell Environ* 1993; **16**: 959-966.
- [91] WARNE TR, HICKOK LG. Single gene mutants tolerant to NaCl in the fern *Ceratopteris*: characterization and genetic analysis. *Plant Sci* 1987; **52**: 49-55.
- [92] WARNE TR, HICKOK LG. Evidence for a gibberellin biosynthetic origin of *Ceratopteris* antheridiogen. *Plant Physiol* 1989; **89**: 535-538.
- [93] WARNE TR, HICKOK LG. Control of sexual development in gametophytes of *Ceratopteris richardii*: antheridiogen and abscisic acid. *Bot Gaz* 1991; **152**: 148-153.
- [94] WARNE TR, HICKOK LG, KINRAIDE TB, VOGELIEN DL. High salinity tolerance in the *stl2* mutation of *Ceratopteris richardii* is associated with enhanced K⁺ influx and loss. *Plant Cell Environ* 1996; **19**: 24-32.
- [95] 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.
- [96] WRIGHT SR, HICKOK LG, WARNE TR. Characterization of mutants of *Ceratopteris richardii* selected on aluminum (Al₂(SO₄)₃-Na₂EDTA). *Plant Sci* 1990; **68**: 257-262.
- [97] YOUNGSTROM CE, GEADELMANN LF, IRISH EE, CHENG CL. A fern *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN* gene functions in both gametophyte and sporophyte generations. *BMC Plant Biol* 2019; **19**: 416.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 19.03.20

Przyjęto: 17.04.20

Mateusz Bartz

ul. Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław

e-mail: mateusz.bartz@uwr.edu.pl

tel.: +48 71 375 4095; fax: +48 71 375 4118