

Kwas giberelinowy indukuje wznowienie podziałów komórkowych w gametofitach paproci *Anemia phyllitidis*

Gibberellic acid induces resumption of cell division in *Anemia phyllitidis* fern gametophytes

ANDRZEJ KAŻMIERCZAK, ANNA BYCZKOWSKA, ANITA KUNIKOWSKA, MAGDALENA DONIAK

A. Kaźmierczak, A. Byczkowska, A. Kunikowska, M. Doniak, Katedra Cytofizjologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, Pomorska 141/143 91-236 Łódź; e-mail: kazand@biol.uni.lodz.pl

ABSTRACT: Endoreplication is a physiological process which accompanies the development of all plants. In *Anemia phyllitidis* gametophytes it was shown that restriction of cell growth by aminooxyacetic acid (AOA), the inhibitor of ACC (1-carboxy-1-aminooxycyclopropane) the ethylene precursor synthesis, inhibited cell division but not DNA synthesis, leading to restriction of gametophyte length as well as to decrease in the number of S- and increase in the number of G2- and endo-phase cells. AOA replacement with gibberellic acid (GA_3) in the culture medium of gametophytes previously treated with AOA or AOA with GA_3 induced division of cells leading to the resumption of cell division and increase in the total number of gametophyte cells and increase G1-, S- and maximal level of DNA endoreplication.

ABSTRAKT: Endoreplikacja jest procesem fizjologicznym, który towarzyszy rozwojowi wszystkich roślin. Wykazano, że zahamowanie wzrostu komórek w gametofitach paproci *Anemia phyllitidis* z zastosowaniem kwasu aminooksyoctowego (AOA), inhibitora syntezy ACC (1-karboksy-1-aminocyklopropan), prekursora syntezy etylenu, hamuje podziały komórkowe, ale nie hamuje syntezy DNA prowadząc do zachowania wzrostu gametofitów na długość, jak również do spadku liczby komórek w fazie S i wzrostu liczby komórek w fazie G2 cyklu komórkowego oraz wzrostu liczby komórek endoploidalnych.

Zastąpienie AOA kwasem giberelinowym (GA_3) w podłożu gametofitów uprzednio hodowanych w obecności AOA lub AOA z GA_3 prowadzi do wznowienia podziałów komórkowych i wzrostu całkowitej liczby komórek gametofitów oraz wzrostu liczby komórek w fazie G1 i S cyklu komórkowego wraz z podniesieniem maksymalnego poziomu endoreplikacji.

KEY WORDS: *Anemia phyllitidis*, cell cycle, ethylene, endoreplication, gibberellic acid

Kaźmierczak A., Byczkowska A., Kunikowska A., Doniak M. 2013. Kwas giberelinowy indukuje wznowienie podziałów komórkowych w gametofitach paproci *Anemia phyllitidis*. *Acta Botanica Silesiaca* 9: 5–24.

Wstęp

Rozwój gametofitów paproci *A. phyllitidis*, gatunku z rodziny *Anemiaceae* (Schuettpelz i Pryer 2007), zależy od aktywności giberelinowych pochodnych, podzielonych na trzy grupy (Kaźmierczak 2010b), zwanych anterydiogenami (Yamane 1998). Czynniki te występują endogennie w gametofitach paproci i kontrolują wzrost komórek, kiełkowanie zarodników oraz rozwój męskich i żeńskich organów rozrodczych, tj. anterydiogenezę i oogenezę (Yamane 1998).

Kwas giberelinowy (GA_3), który jest hormonem z grupy giberelin, fizjologicznie aktywnym u roślin nasiennych (Mander 2003), imituje aktywność kwasu anterydiowego – anterydiogenu strukturalnie podobnego do GA_3 (Yamane 1998) i endogennie występującego w gametofitach paproci *A. phyllitidis* (Schraudolf 1964; Yamane 1998; Kaźmierczak 2010a). GA_3 po egzogennym podaniu do hodowli gametofitów *A. phyllitidis* indukuje przedwczesne tworzenie anterydiów (męskich organów rozrodczych; Schraudolf 1964; Yamane 1998; Kaźmierczak 2010a).

GA_3 kontroluje anterydiogenezę i rozwój gametofitów paproci *A. phyllitidis* między innymi poprzez regulację podziałów komórkowych (Kaźmierczak 2003a). W gametofitach poddanych działaniu GA_3 niektóre komórki, szczególnie strefy anterydialnej, stopniowo zyskują anterydiogenną wrażliwość i stają się komórkami macierzystymi anterydiów (Kaźmierczak 2003a), w których dochodzi do indukcji syntezy DNA (Kaźmierczak 2003a), koniecznej do rozpoczęcia cyklu komórkowego (del Pozo i in. 2006) i tym samym do podziału macierzystych komórek anterydiów (Kaźmierczak 2003a) lub do inicjacji endoreplikacji (endocyklu; Lee i in. 2009).

Przebieg cyklu komórkowego u roślin dotyczy kolejno po sobie następujących faz tj. G1, S, G2 i mitozy, ze szczególnym uwzględnieniem tzw. punktów kontrolnych między fazą G1 i S (tzw. punkt kontrolny G1/S) oraz między fazą G2 i M (tzw. punkt kontrolny G2/M). Ponadto wyróżnia się punkt kontrolny pozwalający na przejście do mitozy, zwany punktem wrzeciona podziałowego, oraz dodatkowe punkty kontrolne, jak punkty wewnętrzne fazy S cyklu komórkowego. Zasadniczą rolę punktów kontrolnych cyklu komórkowego jest kontrola zakończenia oraz prawidłowości syntezy jądrowego DNA. Regulacja przejścia kolejnych punktów kontrolnych cyklu, w ogólnym zarysie, odbywa się w oparciu o zmiany aktywności serynowo-treoninowych cyklino-zależnych kinaz białkowych (CDK), np. CDKA, CDKB, których aktywność jest zależna od specyficznych białek regulatorowych tzw. cyklin (Cyc), np. CycA i CycB. W czasie trwania cyklu komórkowego ilość kinaz nie zmienia się, podczas gdy ilość cyklin zmienia się w czasie cyklu komórkowego. Aby kinaza zyskała aktywność musi powstać kompleks CDK i Cyc. W przypadku punktu kontrolnego G1/S kinaza CDKA w kompleksie z CycD fosforyluje białko retinoblastoma (pRb), co prowadzi do uwolnienia czynnika transkrypcji (E2F) z kompleksu z RB oraz z DP (ang. dimerization

partner). Następnie E2F rozpoczyna kaskadę reakcji związaną z rozpoczęciem fazy S cyklu komórkowego, czyli rozpoczęciem syntezy DNA. Natomiast do rozpoczęcia mitozy, tj. przejścia punktu kontrolnego G2/M, potrzebne są kompleksy CDK (CDKA i B) z Cyc (CycA, B lub D) o ogólnej nazwie MPF (kompleks promujący mitozę), który pozostaje nieaktywny dopóki nie dojdzie do jego defosforylacji z udziałem fosfataz białkowych (Cdc25). Defosforylacja MPF powoduje jego aktywację, w wyniku aktywności kinazowej dochodzi do aktywacji licznych czynników kontroli cyklu komórkowego i rozpoczęcia mitozy. Zakończenie mitozy jest możliwe po ubikwityno-zależnej degradacji cyklin, głównie CycB, z udziałem kompleksu białek promujących anafazę (APC/C; del Pozo i in. 2006; Li i Hang 2009; Kaźmierczak 2010b).

Rozpoczęcie syntezy DNA w apikalnej i anterydialnej strefie gametofitów prowadzi do wzrostu liczby komórek w fazie S cyklu komórkowego indukując podziały komórek somatycznych gametofitu oraz komórek będących macierzystymi komórkami anterydiów (Kaźmierczak 2003a). Podział komórek macierzystych anterydiów jest poprzedzony ich poprzecznym kierunkiem wzrostu, wyznaczonym w stosunku do głównej osi gametofitu (Kaźmierczak 2003a). Wzrost ten, wraz ze zwiększeniem całkowitego rozmiaru komórek macierzystych anterydiów w 12-dniowych gametofitach paproci *A. phyllitidis*, stanowi charakterystyczny morfologiczny przejaw anterydiogenezy indukowanej z udziałem GA₃ (Kaźmierczak 2003a). Omawiane komórki rosnąc osiągają rozmiar ok. 3000 μm² i specyficzny kształt określony stosunkiem ich szerokości do długości, którego wartość wynosi ok. 1,6 (Kaźmierczak 2003a). Bez osiągnięcia tych parametrów komórki macierzyste anterydiów nie uzyskują zdolności do asymetrycznego podziału (Kaźmierczak 2006) i nie tworzą anterydiów (Kaźmierczak 2010a). Podobne ograniczenie zdolności do asymetrycznego podziału komórek macierzystych anterydiów i tym samym hamowanie procesu anterydiogenezy zachodzi w wyniku zahamowania poprzecznego wzrostu komórek macierzystych anterydiów (Kaźmierczak 2006; Kaźmierczak i Kaźmierczak 2009).

Rola etylenu, jedyne go gazowego hormonu roślinnego (Bleecker i Kende 2000), w kontroli podziałów i wzrostu komórek anterydialnych oraz innych komórek gametofitów paproci *A. phyllitidis* także już nie budzi wątpliwości (Kaźmierczak 2003b, 2010a), gdyż ACC, prekursor syntezy etylenu podany egzogennie, wzmacnia ponad dwukrotnie liczbę tworzących się anterydiów indukowanych w obecności GA₃. Ich tworzenie natomiast może być zahamowane aplikacją AOA (kwas aminooksyctowy, inhibitor syntezy ACC) lub NBD (nornornadien, inhibitor receptorów szlaku etylenowego), której towarzyszy spadek zawartości w gametofitach ACC (1-karboksy-1-aminocyklopropan; Kaźmierczak 2007, 2010a; Kaźmierczak i Kaźmierczak 2009) oraz ograniczenie wzrostu komórek gametofitów w kierunku poprzecznym. Ograniczenie tego wzrostu jest związane z usztywnieniem ściany komórkowej (Kaźmierczak 2004), co odzwierciedla się w postaci rozproszonej lub skośnej organizacji mikrofibryl

celulozowych w ścianie komórek strefy anterydialnej gametofitów (Kaźmierczak i Kaźmierczak 2009; Kaźmierczak 2010a). Wzrost poprzeczny jak i wydłużeniowy komórek gametofitów *A. phyllitidis* jest pod kontrolą etylenu, jednakże wzrost wydłużeniowy może być kontrolowany niezależnie od etylenu także przez GA_3 (Kaźmierczak 2004, 2010a).

Fakt, że traktowanie gametofitów paproci *A. phyllitidis* z wykorzystaniem AOA lub mieszaniny GA_3 z AOA (GA_3 /AOA (Kaźmierczak 2004) oraz NBD lub mieszaniny NBD z GA_3 (GA_3 /NBD (Kaźmierczak i Kaźmierczak 2009) zwiększa liczbę komórek w fazie S cyklu komórkowego poprzedzając gromadzenie się komórek w fazie G2 i komórek endoploidalnych (Kaźmierczak 2004, 2010a) świadczy o tym, że etylen nie kontroluje syntezy DNA (Kaźmierczak 2004, 2010a). Za ten proces odpowiedzialny jest zewnętrznie podawany GA_3 (Kaźmierczak 2004, 2010a).

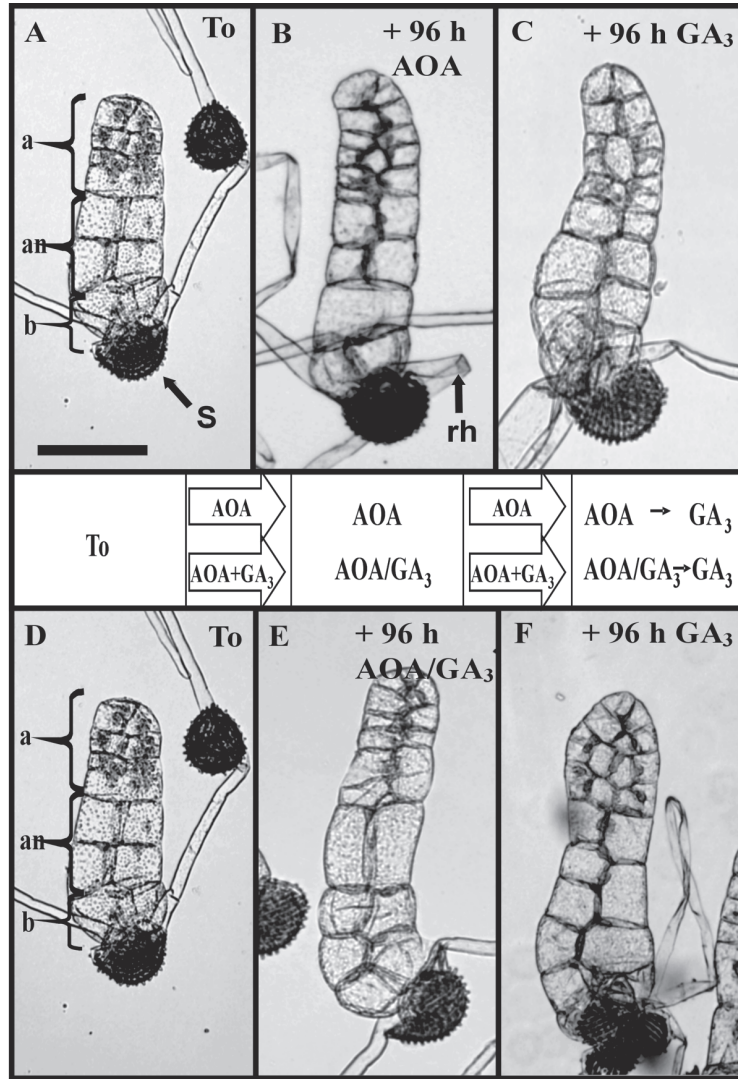
Wyniki te także wskazują, że etylen może być podrzędnym w stosunku do giberelin czynnikiem w kontroli morfogenezy i rozwoju gametofitów paproci *A. phyllitidis* (Kaźmierczak i Kaźmierczak 2007; Kaźmierczak 2010a). Fakt ten dobrze obrazuje sformułowany tzw. “mechanizm regulacji morfogenezy i determinacji płci męskiej” gametofitów *A. phyllitidis* (Kaźmierczak 2010a), w którym etylen jest rozważany jako wtórny przekaznik kontroli morfogenezy i rozwoju gametofitów, podczas gdy GA_3 kontroluje jego aktywność (Kaźmierczak 2006, 2010a) choćby np. przez wpływ na jego syntezę (Kaźmierczak i Kaźmierczak 2009).

Celem niniejszej pracy było uzyskanie odpowiedzi na pytanie: czy zahamowanie wzrostu komórek oraz procesu anterydiogenezy gametofitów paproci *A. phyllitidis* z udziałem AOA jest przejściowe? Do zaplanowanych badań zastosowano dobrze scharakteryzowany “trójstrefowy model budowy i rozwoju gametofitów paproci *A. phyllitidis*” (Kaźmierczak 2003a, b, 2010a).

1. Materiały i metody

2.1. Hodowla gametofitów

Zarodniki *A. phyllitidis* kiełkowały sterylnie w ciemności przez dwa dni. Powstające gametofity hodowano zaś w ciągłym oświetleniu w szalkach Petriego w pożywce Mohra (Kaźmierczak 2003a). Do badań posłużyły 12-dniowe plechy (seria T_0), które poddano działaniu 100 μ M AOA (Sigma) lub 100 μ M AOA z 30 μ M GA_3 (odpowiednio seria AOA i AOA/ GA_3) i hodowano przez 96 h (ryc. 1). Następnie gametofity z obu serii przeniesiono na 96 h do podłoża z 30 μ M GA_3 bez AOA (seria AOA $\rightarrow$ GA_3 i AOA/ GA_3 $\rightarrow$ GA_3 ; ryc. 1). Cytomorfologiczne oraz cytofotometryczne badania prowadzono po 96 h działania na gametofity AOA lub AOA/ GA_3 (tj. w seriach AOA lub AOA/ GA_3) oraz po następnych 96 h działania tylko GA_3 , co odpowiada odpowiednio seriom AOA $\rightarrow$ GA_3 i AOA/ GA_3 $\rightarrow$ GA_3 .



Ryc. 1. Mikrofotografie dwunastodniowych gametofitów paproci *Anemia phyllitidis* (A,D) hodowanych przez 96 h w podłożu zawierającym 100 μM AOA bez (B; seria AOA) lub z 30 μM GA_3 (E; seria AOA/ GA_3) oraz tych gametofitów hodowanych przez kolejne 96 h z 30 μM GA_3 (C; seria AOA $\rightarrow$ GA_3 , F; seria AOA/ $\text{GA}_3\rightarrow$ GA_3). b, an i a, odpowiednio strefa bazalna, anterydialna i apikalna gametofitów; rh, ryzoid; s, spora. Skala dla wszystkich mikrofotografii gametofitów wynosi 100 μm .

Fig. 1. Micrographs of 12-d-old *Anemia phyllitidis* gametophytes (A,D) cultured for 96 h in the medium containing 100 μM AOA without (B; AOA series) or with 30 μM GA_3 (E; AOA/ GA_3 series) and those gametophytes cultured only with 30 μM GA_3 (C; AOA $\rightarrow$ GA_3 series, F; AOA/ $\text{GA}_3\rightarrow$ GA_3) for next 96 h. b, basal, an, antheridial, a, apical zone of gametophytes; rh, rhizoid; s, spore. Bar is 100 μm (for all gametophytes).

2.2. Analizy cytomorfologiczne oraz mikrocytofotometryczne pomiary zawartości DNA oraz oszacowanie liczby komórek zawierających 1C, 1-2C, 2C i więcej niż 2C DNA (endoploidalne komórki)

Cytomorfologiczne analizy gametofitów oraz cytofotometryczne pomiary zawartości DNA w jądrach komórkowych gametofitów prowadzono po ich uprzednim utrwaleniu przez 1 h w mieszaninie Carnoy'a (96% etanol i lodowaty kwas octowy w stos. 3:1). Po płukaniu w serii alkoholi 96% i następnie 70% i po ich uwodnieniu, do obserwacji materiał umieszczano w 86% glicerolu.

Analizy obejmujące liczbę komórek i długość gametofitów, pole profilu komórek (CPA) i ich szerokość (W) oraz długość (L) przeprowadzono w oparciu o pomiary 100-150 gametofitów na każdą serię eksperymentalną (w trzech powtórzeniach) z zastosowaniem programu ScnImage. Dokumentację fotograficzną przeprowadzono z wykorzystaniem programu Act-1 i mikroskopu Nikon (Precoptic, Polska).

Pomiary zawartości DNA, pola powierzchni profilu jąder komórkowych (NPA) i ich średnicy prowadzono po barwieniu gametofitów odczynnikami Feulgena zgodnie z procedurą opisaną wcześniej (Kaźmierczak 2004) z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego Nikon i programu komputerowego ScnImage. Zawartość DNA przedstawiano jako intensywność fluorescencji emitowanej przez jądra barwione odczynnikami Feulgena z około 450-550 jąder z dwóch niezależnych serii eksperymentalnych i wyrażono w jednostkach roboczych (a.u.). Wyniki tych pomiarów posłużyły do przygotowania histogramów w celu określenia procentowego udziału komórek w fazach cyklu komórkowego (G1, S i G2) i w endocyklu (>2C).

2.3. Analizy statystyczne

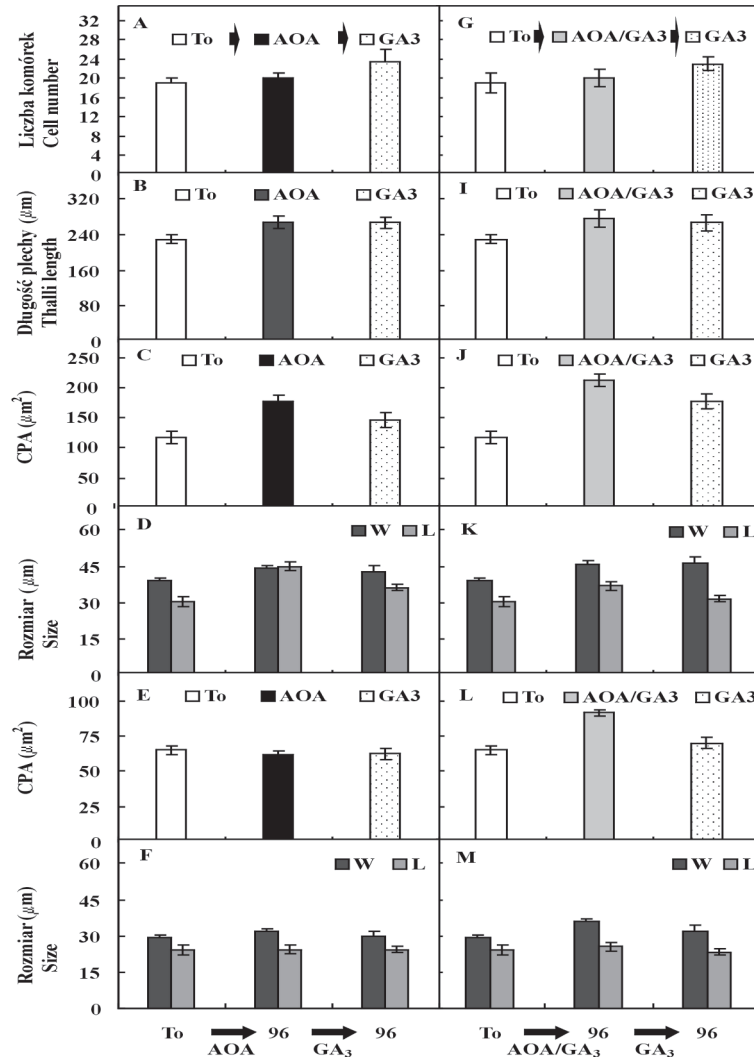
Istotność statystyczną wyników oceniano z wykorzystaniem testu t-Studenta.

3. Wyniki

3.1. Liczba komórek i ich wielkość oraz wielkość gametofitów paproci

W celu wykazania zmian w morfogenezie gametofitów paproci *A. phyllitidis* zastosowano jedne z najważniejszych paramentów charakteryzujących wzrost gametofitów, tj. średnią liczbę komórek, ich pole profilu powierzchni, długość i szerokość anterydialnych i apikalnych komórek gametofitów oraz długość gametofitów w seriach T_0 (ryc. 1A,D), AOA, AOA/GA₃ (ryc. 1B,E), AOA → GA₃ i AOA/GA₃ → GA₃ (ryc. 1C,F; ryc. 2).

W gametofitach poddawanych działaniu AOA (ryc. 1B) lub AOA/GA₃ (ryc. 1E) liczba komórek nie zmieniła się (ryc. 1, 2A,G) w porównaniu z serią T_0 , ale



Ryc. 2. Liczba komórek (A,G), długość plechy (B,I), pole profilu komórki (CPA; C,J) oraz szerokość i długość komórek w strefie anterydialnej (D,K) i strefie apikalnej (E,L, F,M) 12-dniowych (serii T_0) gametofitów paproci *A. phyllitidis* poddanych działaniu AOA (AOA seria) lub AOA z GA_3 (seria AOA/ GA_3) przez 96 h a następnie traktowanych przez 96 h tylko GA_3 (seria AOA→ GA_3 i AOA/ GA_3 → GA_3).

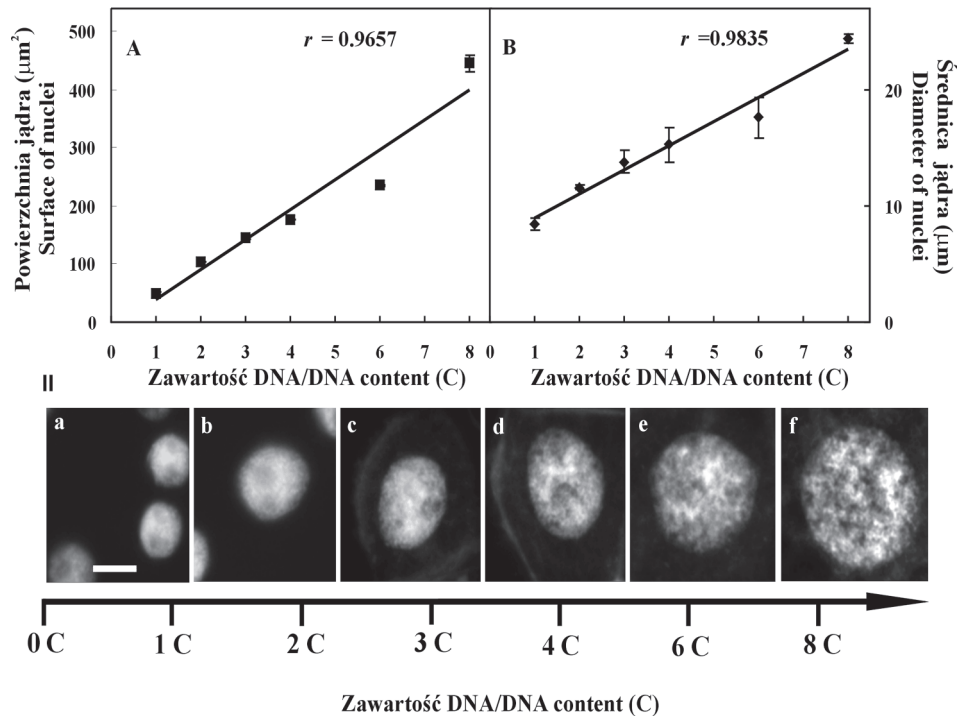
Fig. 2. Cell number (A,G), thalli length (B,I), cell profile area (CPA; C,J) and width and length of antheridial (D,K) and apical (E,L,F,M) zone cells of 12-day-old (T_0 series) *A. phyllitidis* gametophytes treated with AOA (AOA series) or with AOA with GA_3 (AOA/ GA_3 series) for 96 h and those after next 96-h treatment only with GA_3 (AOA→ GA_3 and AOA/ GA_3 → GA_3 series).

o około 20% ($P < 0.05$; ryc. 2B,I) wzrosła długość plech. Po kolejnych 96 h inkubacji z GA_3 opisanych serią $AOA \rightarrow GA_3$ i $AOA/GA_3 \rightarrow GA_3$ (ryc. 1C,F) liczba komórek w gametofitach w porównaniu z serią T_0 (ryc. 1C,F; 2A,G) wzrosła o 20% (ryc. 2A,G), lecz długość gametofitów w porównaniu z serią AOA lub AOA/GA_3 (ryc. 1C,F, 2B,I) nie zmieniała się. Ponadto żaden z gametofitów nie wytworzył anterydiów (ryc. 1C,F).

Pole powierzchni profilu komórek (CPA) strefy anterydialnej w seriach AOA i AOA/GA_3 (ryc. 1B,E; 2C,J) wzrosło odpowiednio o 50% i 80% ($0.01 < P < 0.02$). Wynikało to ze wzrostu szerokości i długości komórek o 15% i 50% w serii AOA i o około 18% i 19% w serii AOA/GA_3 (ryc. 2D,K). W seriach $AOA \rightarrow GA_3$ i $AOA/GA_3 \rightarrow GA_3$ w porównaniu z serią T_0 CPA strefy anterydialnej wzrosło ($P < 0.05$) odpowiednio o 25% (ryc. 2C) i 50% (ryc. 2J). Było to związane ze wzrostem W i L tych komórek odpowiednio o 10% i 19% w serii $AOA \rightarrow GA_3$ (ryc. 2D) i odpowiednio o 19% i 20% w serii $AOA/GA_3 \rightarrow GA_3$ (ryc. 2K). CPA strefy anterydialnej w seriach $AOA \rightarrow GA_3$ i $AOA/GA_3 \rightarrow GA_3$ było mniejsze niż odpowiadającym im komórkom z serii AOA lub AOA/GA_3 . W seriach AOA i $AOA \rightarrow GA_3$ PA komórek apikalnej części gametofitu oraz ich W i L nie zmieniło się (ryc. 2E,F) w porównaniu z serią T_0 , podczas gdy w seriach AOA/GA_3 i $AOA/GA_3 \rightarrow GA_3$ PA wzrosło odpowiednio o 40% i 10% (ryc. 2L). Wynikało to ze wzrostu wartości W i L komórek odpowiednio o 20% i 5% w serii AOA/GA_3 (ryc. 2M) i około 10% wartości komórek w serii $AOA/GA_3 \rightarrow GA_3$ (ryc. 2M), dlatego komórki apikalne z serii $AOA/GA_3 \rightarrow GA_3$ były mniejsze niż te w serii AOA/GA_3 i podobne do wielkości komórek apikalnych w serii T_0 .

3.2. Zawartość DNA

Pomiary mikrocytofotometryczne intensywności fluorescencji emitowanej z jąder komórkowych barwionych odczynnikiem Feulgena, które zastosowano do oceny zawartości DNA w gametofitach paproci *A. phyllitidis* wykazały, że współczynnik korelacji “ r ” wyznaczony pomiędzy zawartościami DNA (wyrażonymi w jednostkach arbitralnych - a.u. – intensywności fluorescencji) a powierzchnią jąder (ryc. 3A-F) wynosił około 0,97 (ryc. 3A). Tą wartość współczynnika zastosowano do oceny zawartości C DNA i przygotowania histogramów do oceny liczby komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Wartość 1C DNA odpowiadająca fazie G1 cyklu zawierała się pomiędzy 0,16 a 0,24 wartości a.u (ryc. 4A-L), podczas gdy wartość 2C DNA odpowiadająca fazie G2 zawierała się w zakresie 0,32 i 48 a.u. (ryc. 4A-L). Komórki z zawartością DNA pomiędzy wskazanymi wartościami to komórki w fazie S cyklu komórkowego, a powyżej wartości 48 a.u. to komórki endoreplikujące, gdzie 3C i 6C DNA oznacza komórki w fazach S endocyklu, a 4C i 8C DNA oznacza komórki, które odbyły odpowiednio jedną i dwie rundy endoreplikacyjne.



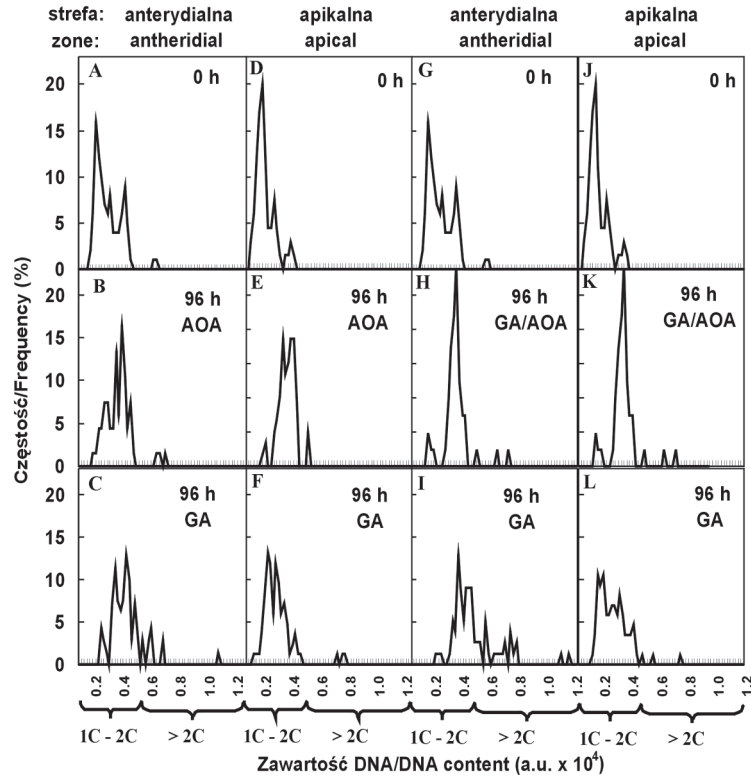
Ryc. 3. Zależność pomiędzy polem profilu jądra komórkowego (NPA; A) lub jego średnicą (B) a zawartością DNA (a-f) wyrażoną w wartościach C w komórkach gametofitów paproci *A. phyllitidis*. Skala wynosi $10\mu m$ i dotyczy wszystkich mikrofotografii.

Fig. 3. Relationship between nuclear profile area (NPA; A) or diameter of nuclei (B) and DNA content in nuclei (a-f) of *A. phyllitidis* gametophyte cells expressed in C values. Bar is $10\mu m$ (for all micrographs).

Porównanie średnicy jąder komórkowych z zawartością C DNA (ryc. 3B; ryc. 3A-F) wykazało, że średnica jąder komórek o zawartości DNA 1C wzrosła z około $8,5\mu m$ do około $24,5\mu m$ dla jąder o zawartości 8C, a wartość współczynnika korelacji “ r ” dla tych parametrów wynosiła 0,98.

3.3. Liczba komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego i w endocyklu

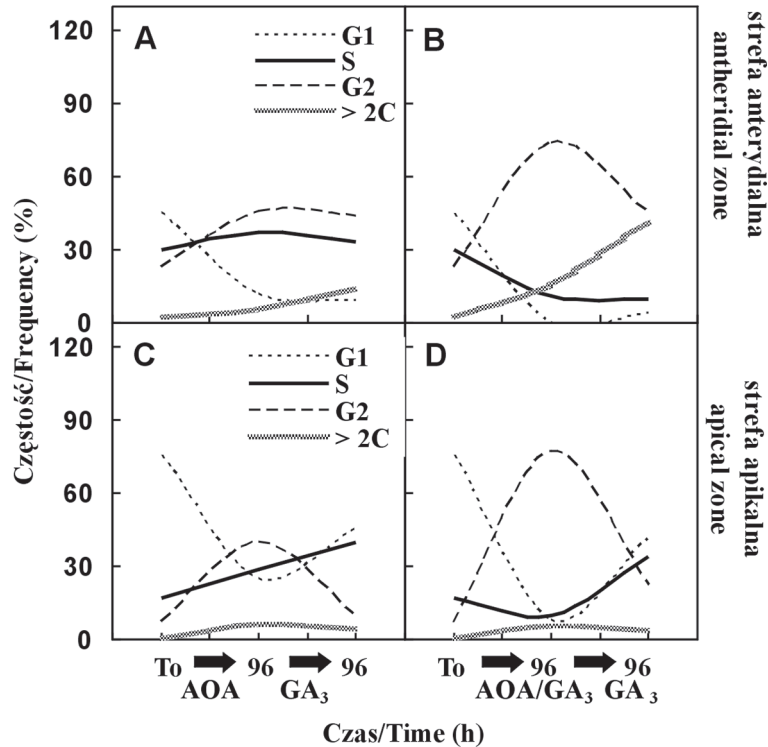
Histogramy (ryc. 4A-L) zawartości DNA pozwoliły oszacować liczbę komórek strefy anterydialnej (ryc. 4A-C; G-I) i apikalnej (ryc. 4D-F, J-L) gametofitów w badanych seriach eksperymentalnych w fazie G1, G2 i S cyklu oraz w endocyklu ($>2C$ DNA; tab. 1; ryc. 5).



Ryc. 4. Histogramy zawartości jądrowego DNA anterydialnej (A,B,C,G,H,I) i apikalnej (D,E,F,J,K,L) strefy gametofitów serii T_0 (A,D,G,J), AOA (B,E), AOA/GA₃ (H,K), AOA→GA₃ (C,F) i AOA/GA₃→GA₃ (I,L) pokazujące rozkład ilości komórek fazy G1 (szczyt ok. 0,2 a.u.), G2 (szczyt ok. 0,4 a.u.) i S (reprezentującej obszar pomiędzy szczytami fazy G1 i G2) cyklu komórkowego oraz komórek endocyklu (reprezentowanych przez jądra zawierające więcej niż 2C DNA).

Fig. 4. Histograms of nuclear DNA content of the antheridial (A,B,C,G,H,I) and apical (D,E,F,J,K,L) zone of gametophytes of T_0 (A,D,G,J), AOA (B,E), AOA/GA₃ (H,K), AOA→GA₃ (C,F) and AOA/GA₃→GA₃ (I,L) series showing distribution of cells in G1 (peak around 0.2 a.u.), G2 (peak around 0.4 a.u.), and S phase (represented as the gaps between the peaks for phases G1 and G2) of cell cycle and in endo-phase (represented as the nuclei containing more than 2C of DNA).

W strefie anterydialnej gametofitów serii AOA liczba komórek w fazie S i G2 cyklu wzrosła odpowiednio z 30% (seria T_0) do 37% oraz z 23% do 46% (tab. 1; ryc. 5A), podczas gdy liczba komórek z fazy G1 znacząco spadła z 45% do 12%. Postinkubacja polegająca na 96-godzinnym traktowaniu gametofitów serii AOA tylko GA₃ (seria AOA→GA₃) doprowadziła do zmniej-



Ryc. 5. Względna liczba komórek w fazie G1, G2, S i w endocyklu w anterydialnej i apikalnej strefie gametofitów *A. phyllitidis* serii T₀, AOA, AOA→GA₃ (A,C) oraz serii T₀, AOA/GA₃ (A,C) i AOA/GA₃→GA₃ (B,D).

Fig. 5. Relative number of cells in G1, G2, S and endo phases in the antheridial (A,B) and apical (C,D) zone of *A. phyllitidis* gametophytes of T₀, AOA, AOA→GA₃ (A,C) as well as T₀, AOA/GA₃ (A,C) and AOA/GA₃→GA₃ (B,D) series.

szczenia się liczby komórek fazy S, G2 i G1 cyklu komórkowego odpowiednio do 9%, 33%, 44%. W apikalnej strefie gametofitów liczba komórek S, G2 i >2C wzrosła odpowiednio z 17%, w serii T₀, do 29%, w serii AOA oraz z 7,5% do 40% i z 0% do 6%, podczas gdy liczba komórek fazy G1 zmniejszyła się z 75,5% do 25% (tab. 1; ryc. 5C). 96-godzinna postinkubacja z GA₃, tj. w serii AOA→GA₃ zwiększyła liczbę komórek fazy G1 i S odpowiednio do 46% i 40% i zmniejszyła liczbę komórek fazy G2 i >2C odpowiednio do 10% i do 4%.

W strefie anterydialnej gametofitów serii AOA/GA₃ liczba komórek fazy G1 i S obniżyła się odpowiednio z 45% do 0% i z 30% do 11%. Natomiast liczba komórek fazy G2 i >2C wzrosła odpowiednio z 23% do 74% i z 2% do

Tabela 1. Względna liczba (%) komórek w fazie G1, G2, S i w endocyklu (Endo), w anterydialnej i apikalnej strefie gametofitów paproci *A. phyllitidis* serii T₀, AOA, AOA→GA₃ oraz serii T₀, AOA/GA₃ i AOA/GA₃→GA₃.

Table. 1. Relative number of cells in G1, G2, S and endo (Endo) phases in the antheridial and apical zone of *A. phyllitidis* gametophytes of T₀, AOA, AOA→GA₃ as well as T₀, AOA/GA₃ and AOA/GA₃→GA₃ series.

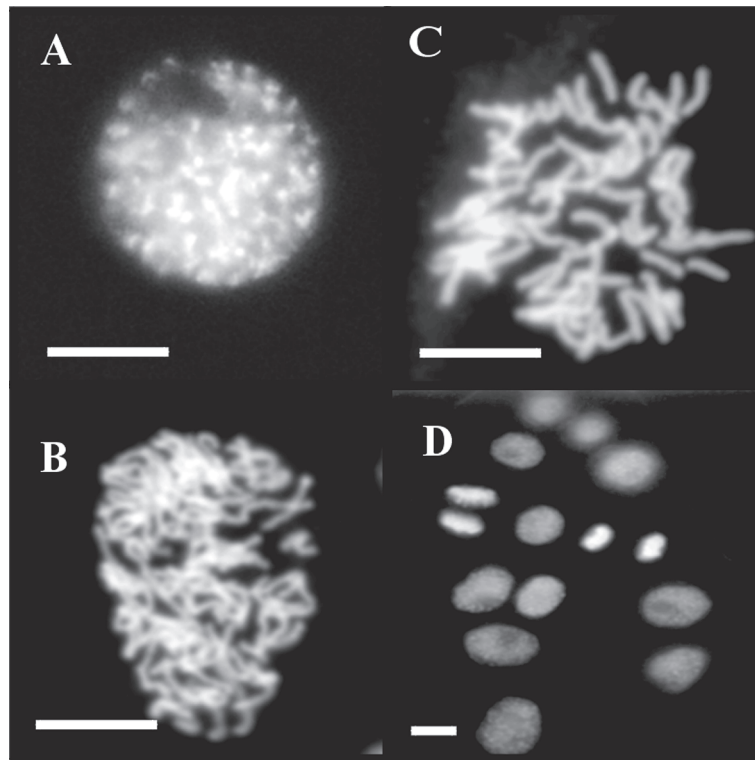
Czas/Time		0	+ 96	+ 96
Strefa gametofitu				
Gametophyte zone				
Seria/Series		To	AOA	GA ₃
Faza Phase				
Anterydialna Antheridial	G1	45	12	9
	S	30	37	33
	G2	23	46	44
	Endo	2	5	14
Apikalna Apical	G1	75,5	25	46
	S	17	29	40
	G2	7	40	10
	Endo	1	6	4
Seria/Series		To	AOA/GA ₃	GA ₃
Anterydialna Antheridial	G1	75,5	0	4
	S	17	11	10
	G2	7	74	45
	Endo	1	15	41
Apikalna Apical	G1	75,5	8	41
	S	17	10	34
	G2	7	77	22
	Endo	1	5	3

15% (tab. 1; ryc. 5B). W strefie anterydialnej gametofitów serii AOA/GA₃→GA₃ liczba komórek fazy S i G2 cyklu spadła odpowiednio do 10% i 45%, (tab. 1; ryc. 5B), natomiast liczba komórek fazy G1 i >2C wzrosła odpowiednio do 4% i 41% (tab. 1; ryc. 5C) wskazując, że niektóre komórki podzieliły się lub zwiększyła się zawartość DNA w zakresie endoreplikacji do wartości 6 lub 8C.

W apikalnej strefie gametofitów serii AOA/GA₃ liczba komórek G1 i S spadła, odpowiednio z 75,5% do 8% oraz z 17% do 10%, podczas gdy liczba komórek G2 i >2C wzrosła odpowiednio z 7,5% do 77% i z 0% do 5%. Postinkubacja

z GA_3 (seria $AOA/GA_3 \rightarrow GA_3$) obniżyła liczbę komórek G2 i $>2C$ z 77% do 22% oznacza to, że komórki fazy G2 podzieliły się, tym bardziej, że liczba komórek G1 wzrosła odpowiednio do 41% (tab. 1; ryc. 5D).

W gametofitach zarówno serii $AOA \rightarrow GA_3$ jak i $AOA/GA_3 \rightarrow GA_3$ zaobserwowano komórki w trakcie podziału mitotycznego, a w szczególności we wczesnej, środkowej i późnej profazie (ryc. 6A-C) oraz we wczesnej i późnej anafazie (ryc. 6C) mitozy. Ponadto w anterydialnej strefie gametofitów serii T_0 , AOA i $AOA \rightarrow GA_3$ endoreplikacja osiąga maksymalny poziom odpowiednio 3, 4 i 6C DNA, podczas gdy w strefie apikalnej odpowiednio 0, 3 i 4C DNA (tab. 2). Natomiast w strefie anterydialnej gametofitów paproci z serii AOA/GA_3 i $AOA/GA_3 \rightarrow GA_3$ zawartość DNA w komórkach osiągnęła poziom odpowiednio 4 i 8C DNA, a w strefie apikalnej tych serii 4C (tab. 2).



Ryc. 6. Mikrofotografie wczesnej (A), środkowej (B) i późnej (C) profazy oraz anafazy (D) mitotycznie dzielących się komórek apikalnej strefy gametofitów *A. phyllitidis*. Skala równa jest 10 μm (A-D).

Fig. 6. Micrographs of nuclei at the early (A), middle (B) and late (C) prophase and at the anaphase (D) mitotically dividing cells of the apical zone of *A. phyllitidis* gametophytes. Bars are 10 μm (A-D).

Tabela 2. Maksymalna zawartość C DNA w jądrach komórkowych endoploidalnych komórek gametofitów paproci *A. phyllitidis* traktowanych przez 96 h 100 μ M AOA lub 100 μ M AOA z 30 μ M GA₃, a następnie przez 96 h 30 μ M GA₃.

Table. 2. The maximal C DNA content in nuclei of *A. phyllitidis* gametophyte endoploid cells treated by 96 h with 100 μ M AOA or with 100 μ M AOA and 30 μ M GA₃ and then by 96 h with 30 μ M GA₃.

Czas/Time		0	+ 96	+ 96
Strefa gametofitu Gametophyte zone				
Seria/Series		To	AOA	GA ₃
Anterydialna Antheridial		3	3,5	6
Apikalna Apical		0	2,5	4
Seria/Series		To	AOA/GA ₃	GA ₃
Anterydialna Antheridial		3	4	8
Apikalna Apical		0	4	4

4. Dyskusja

Badania prezentowane w tej publikacji zostały przeprowadzone z zastosowaniem dobrze opisanego „trójstrefowego modelu struktury i funkcji gametofitów paproci *A. phyllitidis*” (Kaźmierczak 2003a). Model ten pozwala na badania wzrostu i rozwoju gametofitów paproci oraz procesu anterydiogenezy poprzez pomiary liczby komórek, długości plech, pola powierzchni profilu komórek oraz długości i szerokości komórek w trzech wyróżnionych strefach gametofitu tj. strefie bazalnej, anterydialnej i apikalnej, a także poprzez pomiar liczby anterydiów i wielkości wszystkich komórek oraz kształtu i wielkości komórek macierzystych anterydiów w związku z indukcją asymetrycznych i symetrycznych podziałów komórkowych, u podstawy których leży indukcja syntezy DNA (Kaźmierczak 2010a). Wiadomo, że determinacja płci i wzrost poszczególnych komórek gametofitów jak również rozwój całych gametofitów jest kontrolowany poprzez wzajemną zależność pomiędzy endogennie występującymi giberelinami tj. anterydiogenami z kwasem anterydiowym na czele i egzogennie podawanym

GA₃ (Kaźmierczak 2006) oraz endogennie występującym lub egzogennie podanym ACC (Kaźmierczak 2010a). Determinacja płci męskiej w gametofitach paproci *A. phyllitidis* manifestuje się specyficznymi przejawami, spośród których najważniejsze to: (1) indukcja syntezy DNA (Kaźmierczak 2004, 2010a; Kaźmierczak i Kaźmierczak 2009), która bezpośrednio kontrolowana przez GA₃ jest częścią różnicowania się macierzystych komórek anterydiów i prowadzi do powstania anterydiów jak i zwiększenia się liczby komórek somatycznych gametofitów oraz (2) indukcja wzrostu komórek gametofitów poprzez podłużną i poprzeczną ekspansję komórek, która jest kontrolowana z udziałem przede wszystkim etylenu (Kaźmierczak 2003a,b, 2004; Kaźmierczak i Kaźmierczak 2009).

Fakty te zostały także potwierdzone w oparciu o wyniki zamieszczone w niniejszej publikacji. Wyniki te wskazują, że AOA hamując syntezę etylenu w gametofitach paproci *A. phyllitidis*, obserwowaną jako spadek ilości ACC (Kaźmierczak i Kaźmierczak 2009), ogranicza wzrost komórek, który prowadził do zahamowania ich podziałów bez hamowania syntezy DNA. To spowodowało wzrost zawartości DNA w komórkach, czego przejawem było zwiększenie się liczby komórek w fazie S i G2 cyklu komórkowego oraz liczby komórek endoploidalnych. AOA hamując wzrost komórek ograniczał ich podział oraz wzrost i morfogenezę całych gametofitów paproci *A. phyllitidis*. Na podstawie wyników badań okazało się, że proces ten był przejściowy, gdyż usunięcie AOA i postinkubacja gametofitów z GA₃ indukowała wznowienie wzrostu i podziału komórek. Przejawiało się to wzrostem całkowitej liczby komórek bez wydłużenia się gametofitu, gdyż po podziale komórki charakteryzowały się ograniczoną długością, a w czasie postinkubacji nie osiągnęły jeszcze odpowiedniej wielkości lub kształtu przed następnym podziałem (Vriezen i in. 2003).

Otrzymane wyniki wskazują, że wielkość komórek w gametofitach paproci *A. phyllitidis* jest elementem krytycznym dla ich proliferacji. Koordynację wzrostu i podziału komórki określa współczynnik „jądrowo-cytoplazmatyczny” (Jorgensen i Tyers 2004), który pokazuje, że podział każdej komórki może nastąpić po podwojeniu jej masy i wielkości. Wydaje się, że wielkość komórek gametofitów paproci *A. phyllitidis*, wyrażona w CPA, zdolnych do podziału wynosi około 550 μm² (Kaźmierczak 2010a). Ponadto, analizy podziałów komórkowych, będących zasadniczym elementem cyklu komórkowego (Kaźmierczak 2003a; Jager i in. 2005) wykazały spadek liczby komórek w fazie G2 i wzrost populacji komórek w fazie G1 cyklu w apikalnej strefie gametofitów *A. phyllitidis*, w seriach AOA→GA₃ i AOA/GA₃→GA₃. Taka zmiana liczebności komórek świadczy o ich podziale, co potwierdza obliczona na około 5% wartość indeksu mitotycznego (A. Kaźmierczak 2012, mat. npbl.).

Komórki, które wychodzą z cyklu komórkowego, to komórki rozpoczynające proces różnicowania się (Lee i in. 2009). Procesowi temu często towarzyszy zjawisko endoreplikacji, czyli zwiększenia ilości materiału genetycznego na drodze

replikacji bez procesu mitozy (Asano 2009). Zjawisko to dotyczy głównie rozwoju organizmów roślinnych (del Pozo i in. 2006; Kaźmierczak 2010b) i w nielicznych przypadkach zwierząt (Lee i in. 2009). W gametofitach paproci *A. phyllitidis* endoreplikacja bierze udział w kontroli ich wzrostu i rozwoju (Kaźmierczak 2010b), gdzie jest jednym z elementów „postmitotycznego” różnicowania się w stadium 200-stu i 300-stu komórkowym gametofitów (Kaźmierczak 2010b). Wzrost komórek jest fundamentalnym aspektem rozwoju i różnicowania wszystkich wielokomórkowych organizmów (del Pazo 2006), podobnie jak koordynacja proliferacji (Jorgensen i Tyers 2004) i dotyczy także gametofitów paproci *A. phyllitidis* (Kaźmierczak 2010b). W gametofitach paproci *A. phyllitidis* stwierdzono korelację pomiędzy wielkością komórek a zawartością DNA w komórkach endoploidalnych, jednakże dotyczy ona około 12% komórek (Kaźmierczak 2010b). Korelacja ta jest jedną z najważniejszych cech określających proces endoreplikacji u wszystkich roślin (del Pozo i in. 2006).

Jak już wspomniano, endoreplikacja u zwierząt, tylko w nielicznych przypadkach jest jednym z elementów rozwoju i najczęściej jest procesem letalnym (Lee i in. 2009). Wśród znanych przypadków udziału tego procesu we wzroście organizmów zwierzęcych jest rozwój ślinianek muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*; Lee i in. 2009) oraz wzrost neuronów u mięczaków, u których ekspresja genetyczna wzrasta wraz ze zwiększaniem się wielkości ciała osobnika (Yamagishi i in. 2011). Ponadto przejawy endoreplikacji obserwuje się w tzw. trofoblastach łożyska u gryzoni, które biorą udział w zagnieżdżaniu się zarodka w ścianie macicy oraz w komórkach hypodermalnych *Caenorhabditis elegans* (Lee i in. 2009), a także w hepatocytach funkcjonalnych części wątroby, gdy wątroba jest uszkodzona częściową hepatomią. Wówczas endoreplikacja stanowi element regeneracji wątroby i dotyczy komórek, których aktywność podziałowa została zablokowana na skutek utraty integralności telomerów chromosomowych (Lee i in. 2009). Endoreplikacja aktywowana przez uszkodzenie w komórkach macierzystych wątroby jest związana ze wzrostem poziomu transkryptów cykliny D i E1 i jest skorelowana ze wzrostem poziomu ufosforylowanych białek Rb (Dudas i in. 2003). Endoreplikację związaną ze wzrostem ilości cykliny E promującej fazę S cyklu komórkowego obserwuje się także w megakariocytach (Lee i in. 2009).

Stwierdzono, że zmiany w ekspresji genów przesuwające cykl komórkowy z mitotycznego do endoreplikacyjnego są sygnalizowane przez receptory „Notch”, które nie mają charakteru konserwatywnego u roślin (Li i Zhang 2009). Promują one przesunięcie komórek do endocyklu indukując ekspresję białek „fizzy”-zależnych (fzr/Cdh1), aktywatora kompleksu z cyklosomem, czyli APC/C, którego celem jest kierowana przez ubikwitynę proteolityczna destrukcja cyklin mitotycznych i represja ekspresji „dacapo” (dapp21/p27), inhibitora kinaz fazy

S oraz fosfataz białkowych aktywujących kompleks cyklina/kinaza Cdk1, który jest potrzebny do rozpoczęcia mitozy (Lee i in. 2009; Li i Zhang 2009).

U roślin, np. w bielmie nasion kukurydzy, poliploidyzacja jest skorelowana z hyperfosforylacją białek Rb lub ze zwiększoną ekspresją E2F. Podobna sytuacja ma miejsce u *Arabidopsis*, gdzie czynnik E2F indukuje dodatkowe rundy endoreplikacji. Do rozpoczęcia procesu replikacji u roślin jest wymagana także proteoliza mitotycznej cykliny B (CycB) z udziałem APC/C (Sugimoto-Shirasu i Roberts 2003), której towarzyszy niski poziom ekspresji CDK. Aktywność CDK jest wysoka w fazie S i niska w fazach G cyklu komórkowego. Oznacza to, że powtarzającym się rundom replikacji towarzyszy okresowa aktywacja i dezaktywacja CDK fazy S (Lee i in. 2009).

Wyniki przedstawione w niniejszej publikacji wskazują, że w gametofitach paproci *A. phyllitidis*, kiedy wzrost komórek nie jest zahamowany np. poprzez zastosowanie inhibitora syntezy etylenu, egzogenne podanie GA_3 w jednych komórkach wznawia podziały komórkowe a w innych wzrost ilości DNA. Podziały komórkowe widoczne w strefie apikalnej przejawiają się jako wzrost populacji komórek fazy G1 cyklu, podczas gdy wzrost zawartości DNA dotyczy głównie komórek strefy anterydialnej i przejawia się zwiększeniem populacji komórek fazy G2 cyklu komórkowego oraz zwiększeniem się poziomu endoreplikacji.

Wyniki badań nad komórkami zalążni *Ornithogalum umbellatum* prezentowane w pracy Kwiatkowska i in. (2007), wskazują również na fakt, że GA_3 kontroluje zarówno wzrost jak i proces replikacji komórek, ponieważ wraz z wielkością komórek epidermalnych zwiększał się poziom GA_3 i endoreplikacji. Wiadomym jest, że sygnały generowane przez gibereliny mogą być przekazywane z udziałem czynników transkrypcji o nazwie GIS oraz białka nr 8 o charakterze tzw. „palca cynkowego”, który reguluje ekspresję GL1 (potencjalnego czynnika aktywacji transkrypcji w endocyklu), podczas gdy Spy (negatywny regulator aktywności giberelin) powoduje endoreplikację podobną do tej, jaka występuje u roślin typu dzikiego traktowanych wysokimi stężeniami giberelin (Lee i in. 2009).

Wyniki w tej publikacji potwierdzają, że etylen i GA_3 kontrolują wzrost komórek jak i całych gametofitów paproci *A. phyllitidis*, podczas gdy sam GA_3 kontroluje syntezę DNA ważną ze względu na indukcję podziałów komórkowych jak i ze względu na proces endoreplikacji (Lee i in. 2009; Li i Zhang 2009). Wyniki te potwierdzają również fakt, że etylen jako wtórny przekaźnik sygnałów generowanych przez GA_3 łącznie z kwasem anterydiowym w gametofitach paproci *A. phyllitidis* (Kaźmierczak 2010b) nie pełni ważnej roli induktora podziałów komórkowych. Potwierdzają to również badania, w których podanie ACC bez GA_3 (A. Kaźmierczak 2012, mat. npbl.) do hodowli gametofitów uprzednio traktowanych AOA lub AOA z GA_3 nie zmienia wielkości komórek

w gametofitach, ani całkowitej ich liczby, jak również nie zmienia populacji komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego i liczby endo-komórek w porównaniu z tymi komórkami, które zostały poddane postinkubacji tylko z GA₃. Istnieją natomiast doniesienia mówiące o tym, że etylen hamuje proces cytokinezy, ale jednocześnie stymuluje proces endoreplikacji (Dan i in. 2003).

Praca finansowana z działalności statutowej Nr 506/820

Literatura

- ASANO M. 2009. Endoreplication. The advantage to initiating DNA replication without the ORC? – *Fly* **3**: 173–175.
- BLEECKER A.B., KENDE H. 2000. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. – *Annu. Rev. Cell Dev.* 2000: 16: 1–18.
- DAN H., IMASEKI H., WASTENEYS G.O., KAZAMA H. 2003. Ethylene stimulates endoreduplication but inhibits cytokinesis in cucumber hypocotyl epidermis. – *Plant Physiol.* **133**: 1726–1731.
- DUDAS J., SAILE B., EL-ARMOUCHE H., APRIGLIANO I., RAMADORI G. 2003. Endoreplication and polyploidy in primary culture of rat hepatic stellate cells. – *Cell Tissue Res.* **313**: 301–311.
- JAGER S.M., MAUGHAN S., DEWITTE W., SCOFIELD S., MURRAY J.A.H. 2005. The developmental context of cell-cycle control in plants. – *Sem. Cell Develop. Biol.* **16**: 385–396.
- JORGENSEN P., TYERS M. 2004. How Cells Coordinate Growth and Division. – *Curr. Biol.* **14**: R1014–R1027.
- KAŹMIERCZAK A. 2003a. Induction of cell division and cell expansion at the beginning of GA₃-induced precocious antheridia formation in *Anemia phyllitidis* gametophytes. – *Plant Sci.* **165**: 933–939.
- KAŹMIERCZAK A. 2003b. The ethylene is a positive regulator for GA₃-induced male sex in *Anemia phyllitidis* gametophytes. – *Plant Cell Rep.* **22**: 295–302.
- KAŹMIERCZAK A. 2004. Aminoxyacetic acid inhibits antheridiogenesis and development of *Anemia phyllitidis* gametophytes. – *Plant Cell Rep.* **23**: 203–210.
- KAŹMIERCZAK A. 2006. Role of gibberellic acid and ethylene in controlling sex determination in gametophytes of the homosporous fern *Anemia phyllitidis*. – *Bot. Guide* **29**: 119–132.
- KAŹMIERCZAK, A. 2007. Ethylene is a modulator of gibberellic acid induced antheridiogenesis in *Anemia phyllitidis* gametophytes. – *Biol. Plant* **51**: 683–689.
- KAŹMIERCZAK A. 2010a. Gibberellic acid and ethylene control male sex determination and development of *Anemia phyllitidis* gametophytes. W: FERNANDEZ H., REVILLA M.A., KUMAR A. (red.), *Working with Ferns. – Issue and Applications*, s. 49–66.
- KAŹMIERCZAK A. 2010b. Endoreplication in *Anemia phyllitidis* coincides with the development of gametophytes and male sex. – *Physiol. Plant* **138**: 321–328.

- KĄŻMIERCZAK A., KĄŻMIERCZAK J. 2007. The level of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid is increased in *Anemia phyllitidis* gametophytes during GA₃-induced antheridia formation. – *Acta Physiol. Plant.* **29**: 211–216.
- KĄŻMIERCZAK A., KĄŻMIERCZAK J. 2009. Contrasting effects of ethylene perception and synthesis inhibitors on GA₃-induced antheridiogenesis and the level of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in *Anemia phyllitidis* gametophytes. – *Environ. Exp. Botany* **66**: 172–177.
- KWIATKOWSKA M., POPŁOŃSKA K., KĄŻMIERCZAK A., STĘPIŃSKI D., ROGALA K., POLEWCZYK K. 2007. Role of DNA endoreduplication, lipotubuloids, and gibberellic acid in epidermal cell growth during fruit development of *Ornithogalum umbellatum*. – *J. Exp. Bot.* **58**: 2023–2031.
- LEE H.O., DAVIDSON J.M., DURONIO R.J. 2009. Endoreplication: polyploidy with purpose. – *Genes Develop.* **23**: 2461–2477.
- LI M., ZHANG P. 2009. The function of APC/CCdh1 in cell cycle and beyond. – *Cell Div.* **4**: 1–7.
- MANDER L.N. 2003. Twenty years of gibberellin research. – *Natl. Prod. Rep.* **20**: 49–69.
- DEL POZO J.C., LOPEZ-MATAS M.A., RAMIREZ-PARRA E., GUTIERREZ C. 2006. Hormonal control of the plant cell cycle. – *Physiol. Plant* **123**: 173–183.
- SCHRAUDOLF H. 1964. Relative activity of the gibberellins in the antheridium induction in *Anemia phyllitidis*. – *Nature* **201**: 98–99.
- SCHUETTPPELZ E., PRYER K. M. 2007. Fern phylogeny inferred from 400 leptosporangiate species and three plastid genes. – *Taxon* **56**: 1037–1050.
- SUGIMOTO-SHIRASU K., ROBERTS K. 2003. “Big it up”:endoreduplication and cell size control in plants. – *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 544–553.
- VRIEZEN W.H., ZHOU Z., VAN DER STRAETEN D. 2003. Regulation of submergence-induced enhancement shoot elongation in *Oryza sativa*. – *L. Ann. Bot.* **91**: 263–270.
- YAMAGISHI M., ITO E., MATSUO R. 2011. DNA Endoreplication in the brain neurons during body growth of an adult slug. – *J. Neurosci.* **31**: 5596–5604.
- YAMANE H. 1998. Ferns antheridiogens. – *Int. Rev. Cytol.* **184**: 1–31.

Summary

Endoreplication is a physiological process which accompanies the development of all plants, thus the aim of the presented work was to find the answer to the following question: is the AOA-induced inhibition of growth of *Anemia phyllitidis* cells and gametophytes as well as antheridiogenesis transient? Results presented in this paper showed that application of AOA to the culture of *A. phyllitidis* gametophytes restricted of gametophytes length by:

1. restriction of the growth of particular gametophyte cells;
2. inhibition of the cell division but not DNA synthesis;
3. decrease in the number of S-phase cells;
4. increase in the number of G2- and endo-phase cells.

The AOA replacement with GA_3 in the culture medium of gametophytes previously treated with AOA or AOA with GA_3 resumed division of cells leading to increase in the total number of gametophyte cells which was accompanied by decrease in the number of G2-phase and increase of G1- and S- phase cells as well as increased/ elevated DNA content in endoreplicated cells to 8C and appearance of mitotic figures.

These results:

1. confirmed that GA_3 controls cell growth of *A. phyllitidis* gametophytes and upregulates ethylene activity;
2. confirmed that GA_3 controls DNA synthesis;
3. indicated that GA_3 induces the resumption of cell division.

Streszczenie

Endoreplikacja jest procesem fizjologicznym, który towarzyszy rozwojowi wszystkich roślin, a celem niniejszej pracy było uzyskanie odpowiedzi na pytanie: czy zahamowanie wzrostu komórek oraz procesu anterydiogenezy gametofitów paproci *Anemia phyllitidis* z udziałem AOA jest przejściowe. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wykazały, że podanie AOA do hodowli gametofitów paproci *A. phyllitidis* ogranicza wzrost gametofitów poprzez:

1. ograniczenie wzrostu komórek gametofitów;
2. hamowanie podziałów komórek, ale nie syntezy DNA;
3. spadku liczby komórek w fazie S cyklu komórkowego;
4. wzrost liczby komórek w fazie G2 i liczby komórek endoploidalnych.

Zastąpienie AOA w podłożu hodowlanym gametofitów przez GA_3 uprzednio traktowanych AOA lub AOA z GA_3 indukuje wznowienie podziałów komórkowych prowadząc do zwiększenia całkowitej liczby komórek w gametofitach, któremu towarzyszył spadek liczby komórek w fazie G2 oraz wzrost liczby komórek w fazie G1 i S cyklu komórkowego, a także wzrost zawartości DNA w komórkach endoploidalnych do 8C i pojawienie się figur mitotycznych.

Wyniki te:

1. potwierdziły, że GA_3 kontroluje wzrost komórek gametofitów paproci *A. phyllitidis* i kontroluje aktywność etylenu w tym zakresie;
2. potwierdziły, że GA_3 kontroluje syntezę DNA;
3. wykazały, że GA_3 indukuje wznowienie podziałów komórkowych.