

Pojava embriona-blizanaca kod partenogenetske linije jare pšenice *caudata*-Salmon

- Originalni naučni rad -

Slaven PRODANOVIĆ¹ i Fritz MATZK²

¹Poljoprivredni fakultet, Beograd

²Institut za oplemenjivanje bilja IPK, Gatersleben

Izvod: U ovom radu analizirana je pojava embriona-blizanaca u semenima partenogenetske linije *caudata*-Salmon (cS), dobijenim posle oprašivanja sa *aestivum*-Salmon linijom pšenice. Pošlo se od hipoteze da frekvencija embriona-blizanaca zavisi od stadijuma u kojima se nalaze klasovi u vreme oprašivanja. Klasovi su svrstani u četiri stadijuma, od pojave vrha klasa iz rukavca zastavičara do 2-3 dana posle izlaska celog klasa iz lisnog rukavca. Semena su 12 dana nakon oprašivanja otvorena kako bi se odredila frekvencija embriona-blizanaca i izmerile njihove dimenzije. Svaki od embriona-blizanaca sastojao se od jednog krupnijeg i jednog sitnijeg embriona. Dimenzije krupnijih embriona-blizanaca su bile veće u klasovima kasnijih stadijuma, što je ukazivalo na njihov autonomni razvoj. Dimenzije sitnijih embriona-blizanaca su bile iste u klasovima različitih stadijuma, te je zaključeno da se radi o zigotnim embrionima.

Ovo je u skladu sa opažanjima da je veća klica, kada seme cS linije klija sa dve klice, haploidna, a manja diploidna. Frekvencija embriona-blizanaca je bila niža u klasovima ranijih stadijuma. Ta pojava je objašnjena nedovoljnom zrelošću ćelija-majki zigotnih embriona. U embrionovoj kesici razvoj embriona partenogenetskim putem počinje pre nego što je postignuta fiziološka zrelost ćelije-majke zigotnog embriona. Na osnovu položaju zigotnih embriona zaključeno je da se oni najverovatnije razvijaju iz oplodjenih sinergida.

Ključne reči: Embrion, oplodnja, partenogeneza, pšenica, Salmon.

Uvod

Partenogeneza je pojava započinjanja embriogeneze bez oplodnje, *Koltunow i sar.*, 1995, *Bantin i sar.*, 2001, *Vielle-Calzada i sar.*, 1996. *Caudata*-Salmon je partenogenetska linija pšenice. Nastala je iz *aestivum*-pšenice Salmon (aS) sa zigotnim razvojem embriona. U izvornoj liniji aS kratki krak hromozoma 1B je zamenjen kratkim krakom raženog hromozoma 1R. Transfer ovakvog jedra u

citoplazmu *Aegilops caudata* izvršen je serijom povratnih ukrštanja. Dobijena aloplazmična linija *caudata*-Salmon (skraćeno cS) je muški sterilna i odlikuje se sposobnošću autonomnog razvoja embriona, **Matzk**, 1996. Iako razvoj embriona započinje autonomno, razvoj semena zavisi od oplodnje centralne ćelije (pseudogamija). Seme posle oplodnje sadrži haploidnu klicu i triploidni endosperm, te su iznikle cS biljke haploidne. Mehanizam produkcije haploida kod Salmon-linija je široko proučavan, putem ukrštanja uz korišćenje morfoloških markera i aneuploidnih linija. Utvrđeno je da je haploidna partenogeneza Salmon-linija genetički kontrolisana prisustvom gena-induktora partenogeneze (Ptg) lociranog na IRS i jednog citoplazmatskog faktora, a u odsustvu gena supresora partenogeneze (Spg) sa 1BS-hromozoma pšenice, **Tsunewaki** i **Mukai**, 1990. Zapaženo je da neka semena cS linije nastala posle ukrštanja sa aS linijom sadrže dva embriona i da klijaju sa dve nejednako razvijene klice. Ovakvih semena obrazuje se oko 20% kod cS linije pšenice, **Matzk i sar.**, 1995. Na osnovu tečne citometrije (*flow cytometry*) utvrđeno je da manja klica ima dvostruko više hromozoma nego veća klica, odnosno da je diploidna. Frekvencija semena sa dva embriona znatno varira pri ponovljenim hibridizacijama. U ovom radu testirana je hipoteza da frekvencija ovakvih semena, sa embrionima-blizancima, zavisi od starosti klasova cS linije uzetih za oprašivanje. U radu su takođe analizirane dimenzije embriona u cilju tumačenja načina njihovog razvoja.

Materijal i metode

Linije aS i cS su jare pšenice. Njihovo seme je posejano u saksije prečnika 15 cm. Kod cS linija uzete su samo sitnije od dve iznikle biljke za dalji rad. Primenom tečne citometrije utvrđeno je da je svaka od njih bila diploidna. Biljke su gajene do faze početka vlatanja u fitotronu, u sledećim uslovima: temperatura 15°/10°C i fotoperiod 12h/12h. Zatim su prebačene u staklenik, na temperaturu 21°/14°C i dužinu osvetljenja oko 16 h. Za ukrštanja su korišćeni klasovi cS linije koji su svrstani u četiri razvojna stadijuma:

Stadijum 1: Vrh klasa je izašao iz rukavca zastavičara

Stadijum 2: Polovina klasa je izašla iz rukavca zastavičara

Stadijum 3: Ceo klas je izvan rukavca zastavičara (prvi dan)

Stadijum 4: Klas je 2-3 dana izvan rukavca zastavičara.

Klasovi cS linije pšenice su sterilni, te nema potrebe vršiti uklanjanje prašnika. Zbog ove činjenice razvojni stadijumi klasova su povezani sa njihovim položajem u odnosu na zastavičar, a ne direktno sa vremenom cvetanja. Uslovno, stadijum 1 odgovara periodu oko 2 dana pred cvetanje, stadijum 2 je oko 1 dan pred cvetanje, stadijum 3 je cvetanje, a stadijum 4 je period 1 do 2 dana posle cvetanja. Polen linije aS je nanet na žigove linije cS četkicom.

Dvanaest dana posle oprašivanja seme je otvoreno pod stereo-mikroskopom pogodnim alatima, kako bi se odredilo da li sadrži jedno ili dva embriona. Embrioni su izvađeni da bi se izmerile njihove dimenzije u svakoj od ovih faza.

Rezultati i diskusija

Broj oprašenih cvetova i formiranih semena po razvojnim stadijumima klasova cS linije prikazan je u Tabeli 1.

Tabela 1. Broj oprašenih cvetova i formiranih semena cS linije pšenice
Number of Pollinated Flowers and Developed Seeds in cS Wheat Line

Stadijum Stage	Broj oprašenih cvetova Number of pollinated flowers	Broj semena Number of seeds	Sekundarna oplodnja (%) Secondary fertilisation (%)
1	232	8	3,4
2	336	38	11,3
3	252	24	9,5
4	256	64	25,0

U svakom od četiri stadijuma oprašeno je preko dvesta cvetova. Semena su imala razvijen endosperm i nisu ispoljavala nikakve deformacije u obliku. Frekvencija sekundarne oplodnje bila je najmanja (3,4%) kod klasova čiji je vrh tek izašao iz rukavca zastavičara, a najveća (25,0%) kod klasova koji su bili 2-3 dana izvan rukavca zastavičara. Smanjeni procenat sekundarne oplodnje kod mlađih klasova se može objasniti nedovoljnom zrelošću polarnih jedara.

Sva semena sa endospermom su sadržala embrione, što ukazuje da je procenat partenogeneze kod cS linije izrazito visok. *Matzk i sar.*, 1995, konstatuju da je frekvencija autonomnog razvoja embriona kod cS linije pšenice oko 90%.

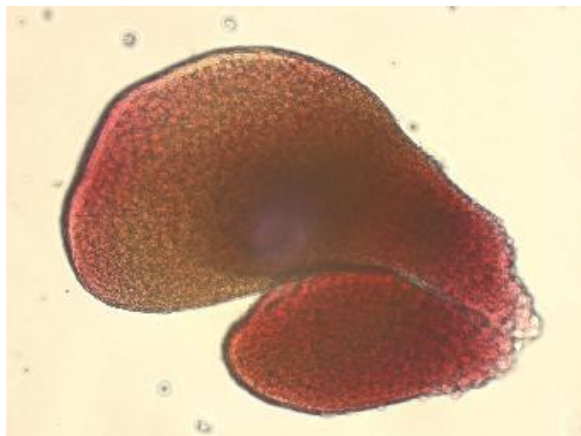
Učešće semena sa dva embriona (embriona-blizanaca) u ukupnom broju semena po razvojnim stadijumima cS linije prikazano je u Tabeli 2.

Tabela 2. Ukupan broj izvađenih embriona i embriona-blizanaca cS linije pšenice
Total number of dissected embryos and twin-embryos in cS wheat line

Stadijum Stage	Ukupan broj embriona Total number of embryos	Broj embriona- blizanaca Number of twin- embryos	Učešće embriona- blizanaca (%) Frequency of twin-embryos (%)
1	8	0	0
2	38	2	5,3
3	24	4	16,7
4	64	14	21,9

Udeo semena koja sadrže embrione-blizance niži je u klasovima koji su oprašeni u ranijim razvojnim stadijumima.

Jedan krupniji i jedan sitniji embrion su jasno diferencirani u svim semenima sa embrionima-blizancima pod stereo-mikroskopom. Na Slici 1 prikazan je jedan embrion-blizanac izvađen iz semena, dok su u Tabeli 3 prikazane su dimenzije izvađenih embriona 12 dana posle oprašivanja.



Slika 1. Embrion-blizanac izvađen iz semena cS linije pšenice
Twin-embryo dissected from seed of cS wheat line

Dimenzije embriona-jedinaca i krupnijih embriona-blizanaca su veće kada su klasovi oprašeni u kasnijim stadijumima. To ukazuje da razvoj ovih embriona nije započeo u istom trenutku. Dimenzije sitnijih embriona-blizanaca nisu zavisile od stadijuma razvoja klasova uzetih za oprašivanje. To znači da je njihov razvoj započeo istovremeno.

S obzirom da je oprašivanje svih klasova izvršeno istovremeno, može se konstatovati da je razvoj sitnijih embriona-blizanaca rezultat oplodnje. S druge strane, embrioni-jedinci i krupniji embrioni-blizanci imaju autonomni razvoj. Ovo je u skladu sa opažanjem da iz krupnijeg embriona-blizanaca niču haploidne biljke, dok iz sitnijeg embriona-blizanaca niču diploidne biljke.

Niža frekvencija embriona-blizanaca u klasovima oprašenim u ranijim stadijumima povezana je sa smanjenom sposobnošću oplodnje. U vreme oprašivanja ovi klasovi sadrže manje zrelih majki-ćelija zigotnih embriona. Odsustvo embriona-blizanaca u klasovima stadijuma 1 i odnos njihovih veličina ukazuje da razvoj embriona partenogenetskim putem započinje pre nego što su stvoreni uslovi za

Tabela 3. Dimenzije izvađenih embriona cS linije pšenice
Dimensions of Dissected Embryos in cS Wheat Line

Stadijum Stage	Dužina embriona (mm) Embryo length (mm)			Širina embriona (mm) Embryo width (mm)		
	Jedinci Single	Blizanci - Twins		Blizanci - Twins	Blizanci - Twins	
		Veći Larger	Manji Smaller		Veći Larger	Manji Smaller
1	2,24	-	-	1,40	-	-
2	2,68	2,80	2,28	1,84	1,52	1,08
3	3,68	3,56	2,32	2,36	1,80	0,96
4	3,72	3,72	2,24	2,40	2,12	1,00

razvoj embriona seksualnim putem. Kod aloplazmične partenogenetske linije *kotschy-Salmon* (kS) je takođe zapaženo da jajna ćelija započinje haploidnu partenogenezu pre oplodnje, **Mukai**, 1986.

Razvoj embriona nastalih partenogenetskim putem dalje je odmakao kod starijih klasova. Njihov autonomni razvoj započinje oko stadijuma 1 (2 dana pre cvetanja), s obzirom da dužina embriona u ovom stadijumu odgovara dužini manjih embriona-blizanaca. Oplodnja centralne ćelije u stadijumu 2, 3 i 4 desila se kada su autonomni embrioni već bili višćelijske globule.

Embrioni-jedinci i veći embrioni-blizanci imali su sličnu dužinu u klasovima svih stadijuma, ali su prvi bili širi od drugih. Ovo je zato što se manji embrion-blizanac uvek nalazi bočno uz većeg, te mu ne ometa rast u dužinu.

Postavlja se pitanje koja ćelija embrionove kesice predstavlja ćeliju-majku manjeg embriona-blizanca. **Kumlehn i sar.**, 2001, su pokazali sposobnost partenogenetskog razvoja jajne ćelije cS linije u *in vitro* uslovima, ali nisu uočili sposobnost partenogenetskog razvoja sinergida i centralne ćelije. Otuda je isključena mogućnost da kod embriona-blizanaca jedan embrion vodi poreklo od autonomne sinergide, a drugi od oplodene jajne ćelije. **Naumova i Matzk**, 1998, su postavili hipotezu da zigotni embrion kod partenogenetskih linija *Salmon* pšenice nastaje oplodnjom sinergide. U ovom radu bočni položaj manjeg embriona-blizanca uz suspenzor većeg blizanca takođe upućuje na to da se radi o oplodenoj sinergidi. **Kumlehn i sar.**, 2001, konstatuju da između sinergida i jajnih ćelija izolovanih iz cS linije pšenice postoji takva morfološka sličnost da se one ponekad ne mogu jasno razlikovati. S obzirom da sinergide cS linije pšenice osim morfološke sličnosti preuzimaju i funkciju jajnih ćelija, one se mogu označiti kao "jajnoj ćeliji-slične-sinergide". Sposobnost oplodnje sinergide u kasnijim stadijumima razvoja se verovatno ispoljila kao kompenzacija za rani početak autonomnog razvoja jajne ćelije. **Mukai**, 1986, je kod kS linije pšenice utvrdio da se jedna od sinergida ponekad razvija kao jajna ćelija i da može biti oplodena tek kada jajna ćelija počne autonomni razvoj.

S obzirom da embrionova kesica ima dve sinergide, postavlja se pitanje da li kod cS linije pšenice samo jedna sinergida može biti oplodena. Iako je u ovom ogledu iz semena izvađeno najviše 2 embriona, pri nicanju biljaka cS linije pšenice koje su korišćene za ukrštanja, nađena je saksija u kojoj su nikla 3 izdanka iz jednog semena. Dva izdanka su bila sitnija, a jedan je bio krupniji. Korišćenjem tačne citometrije utvrđeno je da su sitniji izdanci diploidi, a krupniji haploid. Ovo ukazuje da se može pretpostaviti da obe sinergide mogu biti oplodene, ali da se takva pojava retko događa, s obzirom da obično samo jedno polenovo zrno prodiire u embrionovu kesu.

Zaključak

U semenu cS linije pšenice nastalom posle ukrštanja sa aS pšenicom pojavljuju se embrioni-blizanci, od kojih je uvek jedan krupniji, a drugi sitniji.

Dimenzije krupnijih embriona-bližanaca su veće kada se za oprašivanje koriste klasovi u kasnijim stadijumima. Njihov razvoj započinje autonomno, oko dva dana pre cvetanja. Dimenzije sitnijih embriona-bližanaca ne zavise od stadijuma klasova korišćenih za oprašivanje, što ukazuje da se radi o zigotnim embrionima. Frekvencija embriona-bližanaca se povećava kada se za oprašivanje koriste klasovi u kasnijim stadijumima (posle cvetanja). Partenogenetski razvoj embriona započinje pre nego što je postignuta fiziološka zrelost za oplodnju ćelije-majke zigotnog embriona. Prema položaju zigotnog embriona najverovatnije da sinergida preuzima funkciju majke-ćelije sposobne da bude oplodena.

Literatura

- Bantin, J., F. Matzk** and **T. Dresselhaus** (2001): *Tripsacum dactyloides* (Poaceae): a natural model system to study parthenogenesis. *Sex. Plant Reprod.* 14: 219-226.
- Koltunow, A.M., R.A. Bicknell** and **A.M. Chaudhury** (1995): Apomixis: molecular strategies for the generation identical seeds without fertilisation. *Plant Physiol.* 108: 1345-1352.
- Kumlehn, J., V. Kirik, A. Czihal, I. Altschmied, F. Matzk, H. Lörz** and **H. Baumlein** (2001): Parthenogenetic egg cells of wheat: cellular and molecular studies. *Sex. Plant Reprod.* 14: 239-243
- Matzk, F., H-M Mayer, H. Baumlein, H-J. Balzer** and **I. Schubert** (1995): A novel approach to the initiation of embryo development in *Gramineae*. *Sex. Plant Reprod.* 8: 266-272
- Matzk, F.** (1996): The "Salmon system" of wheat: A suitable model for apomixis research. *Hereditas* 125: 299-301.
- Mukai, Y.** (1986): Genetic control of parthenogenesis in common wheat. *Wheat Information Service* 63: 36-38.
- Naumova, T.N.** and **F. Matzk** (1998): Differences in the initiation of the zygotic and parthenogenetic pathway in the Salmon lines of wheat: ultrastructural studies. *Sex. Plant Reprod.* 11: 121-130
- Vielle-Calzada, J.P., C.F. Grane** and **D.M. Stelly** (1996): Apomixis: the asexual revolution. *Science* 274: 1322-1323.
- Tsunewaki, K.** and **Y. Mukai** (1990): Wheat haploids through the Salmon method. In: "Wheat", *Biotechnology in agriculture and forestry* 13, ed. by Y.P.S. Bajaj, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 460-478.

Primljeno: 16.03.2004.

Odobreno: 15.04.2004.

* *
*

Twin-Embryo Formation in Parthenogenetic Wheat Line *caudata*-Salmon

- Original scientific paper -

Slaven PRODANOVIĆ¹ and Fritz MATZK²

¹Faculty of Agriculture, Beograd

²Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, IPK, Gatersleben

Summary

The twin-embryo formation in seeds of parthenogenetic wheat line *caudata*-Salmon (cS) after crossing to *aestivum*-Salmon (aS) was analysed in this study. The basic hypothesis was that the frequency of twin-embryos was influenced by the developmental stage of cS spikes around the time of pollination. Spikes were separated into four developmental stages: the earliest - the apical part of spike emerged through the slit of the flag leaf sheath and the latest - 2-3 days after the whole spike emerged out of the flag leaf sheath. Twelve days after pollination seeds were opened under a stereo microscope with the aim to determine a frequency and dimensions of twin-embryos. Each twin-embryo consisted of one large and one small embryo. Dimensions of large twin-embryos were greater in spikes of later stages indicating the autonomous development of such embryos. Dimensions of small twin-embryos were similar in spikes of all stages indicating the zygotic development of such embryos. Established developmental pathways of twin-embryos agree well with the observation that the large germ in seeds of cS wheat line germinating with two germs is haploid while the smaller germ is diploid. The frequency of the twin-embryo was higher in spikes of later stages than in spikes of earlier stages. This can be explained by insufficient maturity of mother-cells of zygotic embryos. The embryo development via parthenogenesis in the embryo sac starts before the fertilisation. According to the position of zygotic embryos, apart to the basal suspensor region of parthenogenetic embryos, the most probably they develop from fertilised synergide.

Received: 16/03/2004

Accepted: 15/04/2004

Adresa autora:

Slaven PRODANOVIĆ

Poljoprivredni fakultet

Nemanjina 6

11080 Beograd-Zemun

Srbija i Crna Gora

e-mail: slavenp@agrifaculty.bg.ac.yu