

Agrovoc descriptors: allium, buds, sampling, chromosome number, meiosis, mitosis, evolution, sexual reproduction, plants, genes, recombination

Agris category code: F30

Problematika nabiranja cvetnih brstov za izdelavo preparatov mejoze

Tomaz SINKOVIČ¹

Delo je prispelo 11. januarja 2011, sprejeto 15. septembra 2011.

Received: January 11, 2011; accepted: September 15, 2011.

IZVLEČEK

Opisan je evolucijski pomen mejoze in vzroki za prevlado spolnega načina razmnoževanja pri višjih rastlinah ter pomen prerazporejanja genov (rekombinacija) v profazi prve zoritvene delitve. Predstavljen je razvoj mejoze iz mitoze in razlike med tema celičnima delitvama. Opisano je nabiranje cvetnih brstov čemaža za pripravo mejotskih preparatov. Cvetne brste čemaža smo nabirali v marcu in aprilu 2008. Največ mejotskih faz smo opazili pri cvetnih brstih nabranih v tretjem tednu v mesecu marcu. Optimalna dolžina cvetnih brstov je bila 1 do 1,5 cm. V aprilu so bili cvetni brsti preveč razviti, lahko smo opazovali le pelodna zrna.

Ključne besede: mejoza, *Allium ursinum*, cvetni brsti, nabiranje, redukcija kromosomske števila, razvoj mejoze iz mitoze

ABSTRACT

FLOWER BUD SAMPLING FOR MEIOTIC SLIDE PREPARATIONS

Evolutionary aspect of meiosis and reasons for dominate sexual reproduction in higher plants are described. Conjugation of homologue chromosomes and recombination of genes in prophase of the first meiotic division are presented. Evolution of meiosis from mitosis is discussed. The problems of flower bud sampling for meiotic preparations are presented. Flower buds of *Allium ursinum* were collected in March and April 2008. Best results were obtained by sampling flower buds in the third week of March. For meiotic preparations the optimal length of flower buds was 1 to 1.5 cm. In April the flower buds were over-developed and we could observe developing pollen grains only.

Key words: meiosis, *Allium ursinum*, flower buds, sampling, chromosome number reduction, the evolution of meiosis from mitosis

1 UVOD

1.1 Odkritje mejoze

Mejozo je odkril in prvič opisal nemški biolog Oscar Hertwig (1849 – 1922) leta 1876, na nivoju kromosomov, pa jo je prvi opisal belgijski zoolog Edouard Van Beneden (1846 – 1910). Redukcijska delitev ali mejoza je tesno povezana s spolnim načinom razmnoževanja.

Najpomembnejše sestavine pri delitvah pod mikroskopom vidnih nitastih kromosomov so DNK in

beljakovine. Mejoza ohranja število kromosomov iz generacije v generacijo.

1.2 Evolucijski pomen redukcijske delitve ali mejoze.

Redukcijska delitev ali mejoza zmanjša število kromosomov v gametah na polovico.

Pri redukcijski delitvi se izvrši tudi prerazporejanje (rekombinacija) genov (Louis in Borts, 2003; Ronceret in sod., 2009) ali prekrizanje nesestrskih kromatid

¹ višji pred. mag., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana, Slovenija. E-pošta: tomaz.sinkovic@bf.uni-lj.si

(crossing over). To je proces, ki poveča genetsko pestrost potomcev in je vzrok, da spolni način razmnoževanja predstavlja evlucijsko prednost hitrejšega prilagajanja živih organizmov na spremenjene razmere okolja. Zato spolni način razmnoževanja prevladuje pri rastlinah in glivah (Shonn in sod., 2000). Novejši pogled na evlucijski pomen mejoze je, da ta omogoča popravilo poškodovane DNK. Po tej hipotezi je primarna naloga genskega prerazporejanja pri mejozi popravilo poškodovane DNK (Smith, 2004). Sparjeni homologni kromosom je šablona, ki vodi popravilo poškodovane DNK, ki se na ta način pomladi.

2 MATERIAL IN METODE

Brste čemaža, ki je uspeval pri glavnem vhodu na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete (BF) smo nabirali v mesecu marcu in aprilu 2008.

Mejozo lahko pri rastlinah opazujemo, če nabereimo mlade neodprte cvetne brste. Brste fiksiramo v sveže pripravljene mešanici etanola in oetne kisline v razmerju 3:1 in jih spravimo v hladilnik.

Precej zamudno je iskanje prave razvitosti cvetnih brstov za opazovanje stadijev mejoze. Pri čemažu smo cvetne brste nabirali tedensko ves mesec marec in april 2008.

Za opazovanje preparatov iz cvetnih brstov pod mikroskopom z binokularno lupo izberemo ponavadi mlade prašnice (moška

Prve evkariotske vrste so bile enocelične haploidne oblike in so se razmnoževale z mitozo. Enostavni evkarioti kot so protisti in glive se mitotsko razmnožujejo v haploidnem in diploidnem stanju. Diploidnost predstavlja skoraj gotovo sekundarno razvojno stanje. Enoceličarji iz katerih izvirajo prve mejotske delitve so obstajali pred več kot milijardo let, njihova sled je že dolgo zabrisana (Wilkins & Holliday, 2009). Začetna naloga homolognega kromosomskega parjenja (sinapsis) je bila presenetljivo zmanjšanje ne pa povečanje genske pestrosti.

linija mejoze). Zarodne celice mikrospor mečkamo na objektih stekelcih, obarvamo z acetokarminom ter preparate ogrejemo nad gorilnikom (Göltenboth, 1978). Nato opazujemo zarodne celice pelodnih zrn pod mikroskopom pri 400 x povečavi. Slike stadijev mejoze smo posneli z raziskovalnim mikroskopom "Olympus" Provis z digitalno kamero na naši katedri. Slike smo digitalno obrezali in povečali s programsko opremo za digitalno analizo slike "Olympus" DP Controller.

Mejoza je bolj zapletena kot mitoza, ker nastopata dve zaporedni zoritveni delitvi in tudi stadijev je več. Da opazimo vse stadije je potrebno narediti več mikroskopskih preparatov iz različno razvitih (velikih) cvetnih brstov.

3 REZULTATI

Največ mejotskih stadijev smo opazovali pri cvetnih brstih nabranih v tretjem tednu v mesecu marcu. Optimalna je bila dolžina cvetnih brstov med 1 in 1,5 cm. V aprilu je bilo nabiranje neuspešno, ker je bila mejoza zaključena in smo lahko opazovali le pelodna zrna.

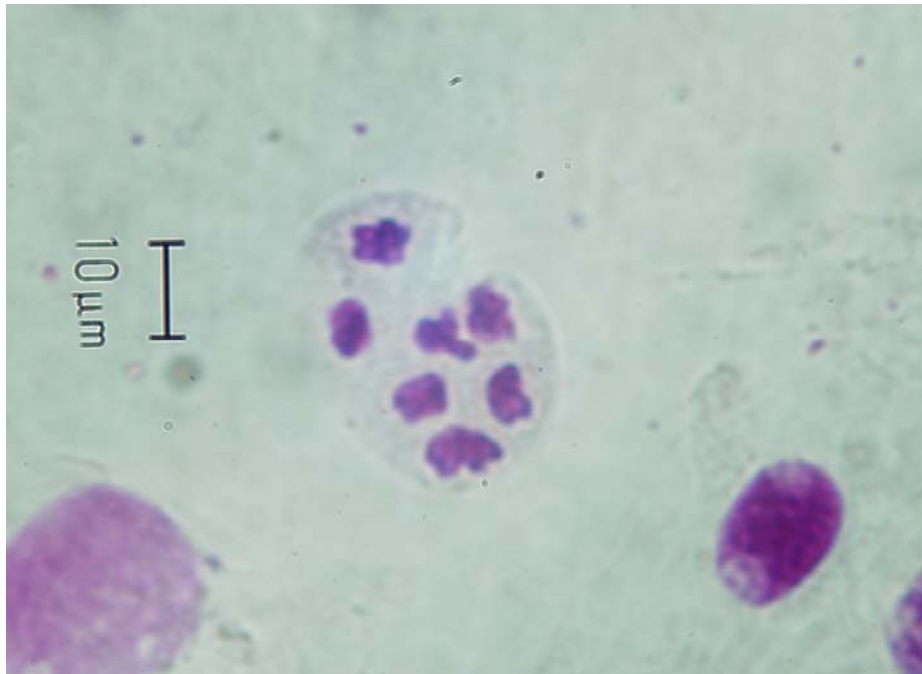
Slike mejotskih stadijev čemaža

Diakineza je zadnji stadij profaze prve mejotske delitve (slika 1.) Nato sledi metafaza prve zoritvene delitve in anafaza, kjer pride do dejanskega zmanjšanja kromosomskega števila na polovico, saj se s pomočjo niti delitvenega vretena ločijo celi homologni kromosomi in ne sestrskse kromatide, ki ostanejo spojene zaradi povečane kohezije (Petronczki in sod. 2003).

Motnje pri parjenju homolognih kromosomov vodijo do nesparjenih kromosomov - univalentov in trivalentov. Motnje pri segregaciji kromosomov v mejozi (nondisjunction) vodijo do kromosomskih aberacij - anevvuploidij, pride lahko do monosomij ali trisomij (Petronczki in sod., 2003; Sanso in Wulff, 2007).

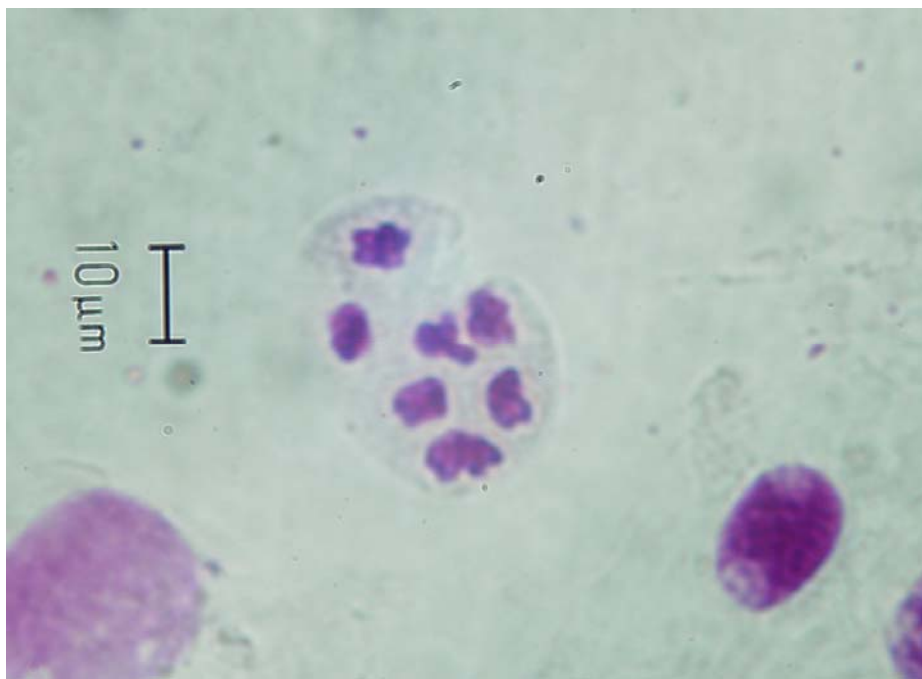
Končni stadij prve mejotske delitve je celična diada (slika 2.).

Sledi druga zoritvena delitev enaka mitozi in služi samo za povečanje števila gamet. Končni stadij (telofazo) predstavljajo 4 haploidna jedra ali celična tetraada (slika 3.). Zaradi pojava prerazporejanja genov, vsebuje vsako jedro nekoliko drugačne dedne zasnove.



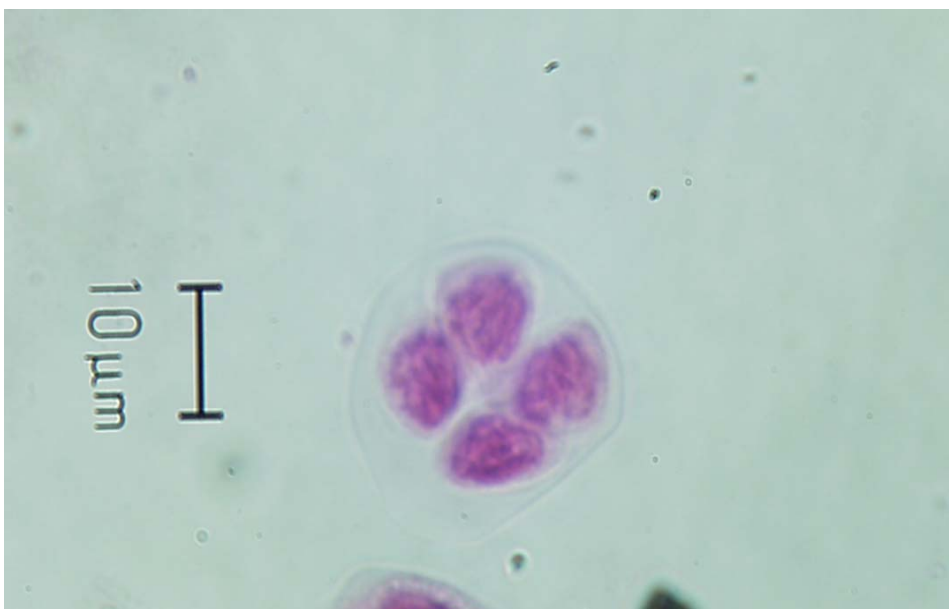
Slika 1: Diakineza – zadnje obdobje profaze prve zoritvene delitve. Na mikroskopski sliki je sedem bivalentov (sparjenih homolognih kromosomov) čemaža (*Allium ursinum* L.), ki ima telesno kromosomsko število $2n = 14$.

Figure 1: Diakinesis – the last period of prophase of the first meiotic division. The seven bivalents of ramsons (*Allium ursinum* L.) are shown, with the somatic chromosome number $2n = 14$.



Slika 2: Celična diada je telofaza prve zoritvene delitve z dvema haploidnima jedroma.

Figure 2: Cell diade is the telophase of the first meiotic division with two haploid nuclei.



Slika 3: Celična tetrada je končni stadij druge zoritvene delitve s štirimi haploidnimi jedri.

Figure 3: Cell tetrad is the final phase of the second meiotic division with four haploid nuclei.

4 ZAKLJUČEK IN DISKUSIJA

Značilnost prve zoritvene delitve ali mejoze I je, da iz ene diploidne zarodne celice nastaneta dve haploidni jedri (celična diada). Pri drugi zoritveni delitvi ali mejozi II iz dveh haploidnih jeter nastanejo 4 haploidna jedra (celična tetrada).

Podobno kot pri mitozii ločimo štiri faze tudi pri mejozi. Osnovne značilnosti faz mejoze so podobne kot pri mitozii. Prva je profaza, sledi metafaza, nato anafaza in končno telofaza pri prvi in drugi zoritveni delitvi.

Mejotski kromosomi so drugače oblikovani kot mitotski kromosomi v telesnih celicah iste rastline. Mejoza se je zelo verjetno razvila iz mitoze (Wilkins in Holliday 2009) in ima štiri nove dogodke v primerjavi z mitozo:

- parjenje homolognih kromosomov,
- pojav genetskega prerazporejanja med nesestrskimi kromatidami,
- v prvi zoritveni delitvi se ne ločujejo kromatide ampak celi homologni kromosomi,
- dedni material se v drugi zoritveni delitvi ne podvaja (brez S faze).

Mejoza se kot mitozia prične z podvajanjem DNK, tvorijo se celice z štirimi kromatidami za vsak homologni kromosomski par, dve kromatidi izvirajo iz matere rastline, dve iz očetove. Tudi pri mejozi obstajajo kontrolne točke (Jezernik in Komel, 1998), ki preverjajo predhodne dogodke v mejozi in nato sprožijo procese naprej ali jih ustavijo. V profazi I mejotske delitve obstaja pahitenska kontrolna točka (Roeder in Bailis 2000), nato še rekombinacijska kontrolna točka (Malone in sod. 2004) in druge kontrolne točke.

Največ mejotskih stadijev čemaža smo opazovali pri cvetnih brstih nabranih v mesecu marcu in približni dolžini cvetnih brstov 1 do 1,5 cm. Pri enaki dolžini cvetnih brstov v aprilu je bilo opazovanje neuspešno. Verjetno so mejotski stadiji pri čemažu vezani na koledarsko obdobje (dolžina dneva, temperatura) in hkrati je tudi potrebna optimalna razvitost cvetnih brstov (med 1 in 1,5 cm).

5 VIRI

Nilton Cesar Pires Bione, Maria Suely Pagliarini, Jose Francisco Ferraz de Toledo 2000. Meiotic behavior of several Brazilian soybean varieties. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 3, 623-632.

Darlington, C. D. 1957. *Chromosomen Botanik*. Georg Thieme Verlag – Stuttgart, 160 str.

- Denffer, H., Ziegler H. 1979. Botanika - morfologija i fiziologija. Školska knjiga Zagreb, 586 str.
- Dubravec, K. 1993. Botanika. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, 538 str.
- Göltenboth, F. 1978: Chromosomen-praktikum. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 212 str.
- Jezernik, K. in Komel R. 1998: Celični cikel. *Proteus* (7) 60, s. 306-316.
- Louis, E. J., Borts, R. H. 2003. Meiotic Recombination: Too much of a good thing? *Current Biology*, 13: 953-955.
- Malone, R. E., Haring, S. J., Foreman, K. E., Pansegrau, M. L., Smith, S. M., Houdek, D. R., Carpp, L., Shah, B., Lee, KariAn E. 2004. The signal from the initiation of meiotic recombination to the first division of meiosis. *Eucaryotic Cell*, June 2004: 598-609.
- Martinčič, A., Wraber, T., Jogan, N., Ravnik, V., Podobnik, A., Turk, B., Vreš, B., Frajman, B., Strgulc Krajšek, S., Trčak, B., Bačič, T., Fischer, M. A., Eler, K., Surina, B. 2007: Mala flora Slovenije, Tehniška založba, Ljubljana, 967 str.
- Naranjo C. A., Ferrari M. R., Palermos A. M., Poggio L. 1998. Karyotype, DNA content and meiotic behaviour in five south american species of *Vicia* (Fabaceae). *Annals of Botany*, 82: 757-764.
- Miko, I. 2008. Mitosis, Meiosis and inheritance. *Nature Education* 1(1):1-3.
- Moore, R., Clark, W. D., Stern, K. R., Wodopich, D. 1995. *Botany*. Wm. C. Brown Communications, Inc. 2460 Kerper Boulevard, Dubuque, IA 52001, USA. 824 str.
- Nultsch, W. 2001. *Allgemeine Botanik*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 663 str.
- Petronczki, M., Siomos, M. F., Nasmyth, K. 2003. Un menage a quatre: The molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell*, Vol. 112: 423-440.
- Roeder, G. S., and Bailis, J. M. 2000: The pachytene checkpoint. *Trends Genet.* 116:395-403.
- Ronceret, A., Doutriaux M. P., Golubovskaya I. N., Pawlowski W. P. 2009. PHS 1 regulates meiotic recombination and homologous chromosome pairing by controlling the transport of RAD50 to the nucleus. *PNAS*, Vol. 106, No. 47: 20121-20126.
- Rutkowska, J., Badyaev, A. V. 2008. Meiotic drive and sex determination: molecular and cytological mechanisms of sex ratio adjustment in birds. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 363: 1675-1686.
- Sanso, A. M., Wulff A. F. 2007. Meiotic irregularities in *Alstroemeria andina* var. *venustula* (Alstroemeriaceae). *Botanical Studies*, 48: 311-317.
- Shonn, M. A., McCarroll R., Murray A. W. 2000. Requirement of the spindle checkpoint for proper chromosome segregation in budding yeast meiosis. *Science*, 289: 300-303.
- Sitte, P., Weiler, E.W., Kadereit, J. W., Bresinsky, A., Koerner, C. (eds.) 2002. *Strasburger Lehrbuch der Botanik*. 35. Auflage. Spectrum Gustav Fischer Verlag, Stuttgart; 1123 str.
- Smith, K. C. 2004. Recombinational DNA repair: The ignored repair system. *BioEssays*, 26:1322-1326.
- Wilkins, A. S., Holliday, R. 2009. The evolution of meiosis from mitosis. A Publication of the Genetic Society of America. January 2009, *Genetics*, 181:3-12.