

Endoreduplikacja jako jeden z mechanizmów zmiany ilości jądrowego DNA w komórce roślinnej

Józef KRAWCZYK, Iwona WĄSEK

KRAWCZYK J., WĄSEK I. 2011. **Endoreduplication and other reasons of quantitative changes in nuclear DNA in plant cell.** *Wiadomości Botaniczne* 55(3/4): 7–22.

Cell polyploidisation in plants is mainly achieved by endoreduplication or endomitosis. Endoreduplication is often described as a process or variant cell cycle, in which cells amplify their genome without chromatin condensation, chromosome segregation or cytokinesis, leading to the production of chromosomes with 2n chromatids without any change in chromosome number. This process is common in plants and animals, especially in tissues with high metabolic activity, despite but of this, little is known about the physiological role and mechanism regulating this process. It is not clear wheather endoreduplication is genetically programmed or is a consequence of the diferentiation.

In this paper we review data on physiological significance polyploidisation, especially endoreduplication in plants, and data about molecular mechanism regulating this process.

KEY WORDS: genome size, polyploidisation, topoisomerase, DEL1, mitotic cyclin, CKI, kinase *Wee1*.

Józef Krawczyk, Iwona Wąsek, Uniwersytet Pedagogiczny im. KEN, Instytut Biologii, Zakład Genetyki i Biologii Komórki, ul. Podbrzezie 3, 31-054 Kraków, e-mail: iwonkawasek@gmail.com, mj.krawczyk_xl@wp.pl

WSTĘP

Rozwój roślin podobnie jak i innych organizmów tkankowych odbywa się poprzez podziały komórek, wzrost objętościowy i ich specjalizację. Zwiększenie liczby komórek jest efektem następujących kolejno po sobie cyklów komórkowych. Cykl komórkowy to sekwencja zdarzeń, zachodzących od powstania komórki do podziału na dwie potomne komórki. W fazie G₁ komórki są dwukrotnie mniejsze od macierzystych. W okresie międzypodziałowym mają miejsce przemiany: biofizyczne, biochemiczne i strukturalne, które prowadzą do powstania organelli, syntezy substancji

niezbędnych do rozwoju i wzrostu. Najistotniejszym procesem w cyklu komórkowym jest replikacja materiału genetycznego i jego precyzyjny rozdział do nowo powstałych komórek. Struktura jądra i procesy w nim zachodzące zmieniają się w czasie rozwoju rośliny: inny jest w komórkach merystematycznych (intensywnie dzielących się), a inny w komórkach różnicujących się. Komórki roślinne mogą przechodzić w tkankę stałą, zarówno w fazie G₁ (2C) jak i w G₂ (4C). Mechanizm kontrolujący przejście komórki z cyklu mitotycznego do programowego różnicowania się nie jest w pełni poznany. U roślin proces specjalizacji komórek jest często skorelowany ze zwielokrotnieniem

jądrowego materiału genetycznego (Nagl 1976). Wzrost poziomu ploidalności może dokonać się na drodze:

- endoreduplikacji (całkowitej, niepełnej),
- endomitozy,
- fuzji jąder,
- fuzji komórek,
- nieprawidłowego rozdziału chromosomów

w kariokinezie prowadzącego do powstania jąder aneuploidalnych.

Endomitoza jest to podział chromosomów w obrębie otoczki jądrowej. W metafazie i anafazie chromosomy rozrzucone są na terenie całego jądra. Brak wrzeciona podziałowego uniemożliwia rozejście się chromatyd do przeciwległych biegunów, dlatego po telofazie jądro zawiera podwojoną liczbę chromosomów (Tab. 1, Ryc. 1). W endospermie u *Delphinium × kotulae* opisano początkowe stadia mitozy do metafazy, a liczbę chromosomów w powstałych jądrach restytucyjnych określono na poziomie $24n$ (Jankun 1970, 1973). Więcej informacji o zmianach kariologicznych w endospermie spowodowanych między innymi endomitozą zostało podanych w pracy Rychlewskiego (1969).

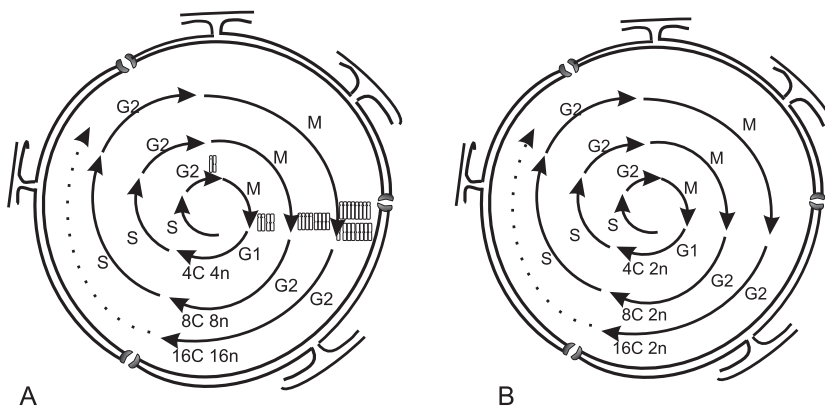
Podczas endoreduplikacji komórka po zakończeniu fazy S wchodzi w fazę G_2 , następnie w G_1 z pominięciem mitozy i cytokinezy. Proces ten może powtarzać się wielokrotnie. W wyniku tego procesu w jądrze następuje zwielokrotnienie całości lub części materiału genetycznego, ale nie zmienia się liczba chromosomów (Joubert, Chevalier 2000, Edgar, Orr-Weaver 2001) (Tab. 1, Ryc. 1). W procesie niepełnej replikacji replikowana jest większa część genomu, natomiast pomijane są niewielkie fragmenty heterochromatynowe. Jeżeli w obrębie genomu replikacji ulegają tylko niewielkie odcinki DNA, to taki proces nazywany jest amplifikacją (Turała-Szybowska 1979).

U roślin programowa fuzja jąder ma miejsce podczas podwójnego zapłodnienia. Jedna z komórek plemnikowych łączy się z komórką jajową, a druga z komórką centralną, wyposażoną w jądro powstałe przeważnie w wyniku połączenia jąder biegunowych. Fuzje jąder były też obserwowane u mieszańców w komórkach stożku wzrostu korzenia (Rozmus et al. 1999a), jak i w tkankach merystematycznych roślin traktowanych czynnikami mutagennymi

Tabela 1. Charakterystyka cyklu mitotycznego i procesów prowadzących do zmiany zawartości DNA w jądrach komórkowych: n – liczba chromosomów, C – ilość DNA w gametach.

Table 1. Characterisation of mitotic cycle and processes leading to change of this nuclear DNA content: n – chromosomes number, C – DNA content in gamets.

Proces Process	G_2		Podział Division		Efekt Effect			
		Liczba komórek Number of cells	Mitoza Mitosis	Cytokineza Cytokinesis	Jądra Nuclei			Liczba komórek Number of cells
					Liczba Number	C	n	
Cykl mitotyczny Mitotic cycle	4C, 2n	1	tak yes	tak yes	2	2C	2n	2
	4C, 2n	1	tak yes	brak no	2	2C	2n	1
Endomitoza Endomitosis	4C, 2n	1	brak no	brak no	1	4C	4n	1
Endoreduplikacja Endoreduplication	4C, 2n	1	brak no	brak no	1	4C	2n	1
Fuzja jąder Fusion of nuclei	(4C, 2n)	1	brak no	brak no	1	4C	4n	1
Fuzja komórek Cell fusion	4C, 2n	2	brak no	brak no	2	4C	2n	1



Ryc. 1. Porównanie endomitozy (A) i endoreduplikacji (B), opis w tekście (rysunek własny).

Fig. 1. Schematic representation of endomitosis (A) and endoreduplication cycle (B). Detailed description in text (own picture).

(Rozmus et al. 1999b). Powstawanie komórek w wyniku fuzji komórek zostało opisane u roślin zaatakowanych przez patogeny (Williamson, Hussey 1996). Fuzja komórek może być także obligatoryjnym etapem organogenezy jak np. formowanie się długich włókien mięśni szkieletowych u kręgowców. Takie procesy jak: endoreduplikacja, podział chromosomów bez rozdzielania chromatyd do jąder potomnych i fuzja jąder nie prowadzą do powstania nowych komórek. Zmiany ilości materiału genetycznego dokonują się wewnątrz otoczki jądrowej i zachodzą po zakończeniu proliferacji oraz związane są ze specjalizacją i formowaniem się tkanek stałych (Nagl 1976). Przedstawiona krótka charakterystyka endoreduplikacji, endomitozy i fuzji jąder nie jest całkowicie zgodna z definicją cyklu komórkowego i dlatego wymienione zjawiska należy uznać za fakultatywne etapy specjalizacji komórek.

Poliploidyizacja tkanek jest zjawiskiem powszechnym, powstały organizm jest kompleksem złożonym z komórek, z których jedne pozostają diploidalne, inne osiągają wyższe stopnie ploidalności. Miksoploidalność i mozaikowość polegają na występowaniu w jednym organizmie komórek różniących się liczbą chromosomów. Liczba ta może być euploidalna lub aneuploidalna. Polisomatyczność występuje wtedy, gdy w procesie różnicowania tkanek w tym samym

organie/tkance obecne są komórki o różnej zawartości DNA (najczęściej podwyższonej) (Smulders et al. 1994).

WYSTĘPOWANIE ENDOREDUPLIKACJI

Zjawisko endoreduplikacji występuje u wielu organizmów eukariotycznych (Brodsky, Uryvaeva 1977). W królestwie roślin endoreduplikacja jest szeroko rozpowszechniona i została opisana po raz pierwszy u *Allium cepa* w strefie elongacyjnej korzenia traktowanego hormonami (Levan 1939). U okrytozalążkowych zjawisko endoreduplikacji nie występuje tylko w tkankach merystematycznych, komórkach macierzystych i w gametach (Nagl 1978, Traas et al. 1998, Cebolla et al. 1999, Jacquemard et al. 1999). Natomiast powszechnie jest opisywana w organach związanych z rozmnażaniem płciowym, np. w woreczku zalążkowym, tapetum, niektórych tkankach tworzących owoc (Turała 1969, Nagl 1974, Lemontey et al. 2000, Kudo, Kimura 2002). Jądra poliploidalne lub chromosomy olbrzymie były identyfikowane: w antypodach i synergidach u *Allium ursinum* (Hasitschka-Jenschke 1957), *Ranunculus baudotii* (Wędzony 1982), w endospermie i suspensorze u *Phaseolus* (D'Amato 1964, Nagl 1974, 1976), w bielmie (Kowles, Phillips 1985), w liściach u *Arachis hypogaea* (Dhillon, Miksche

1982) i w komórkach mięsistych owoców *Lycopersicon esculentum* (Teyssier et al. 2008), jak również zostały opisane w komórkach wysoce wyspecjalizowanych np. we włosniakach korzeniowych u *Elodea* (Dosier, Riopel 1978), epidermie u *Phaseolus* (Kinoshita et al. 1991), dużych komórkach zawierających rafidy u *Vanilia* (Kausch, Horner 1984), trichomach u *Bronia* (Barlow 1975) i włoskach u *Arabis* (Sako et al. 2010). Wśród roślin wysoki poziom endoreduplikacji stwierdzono między innymi w komórkach suspensora u kilku gatunków fasoli (*Phaseolus coccineus* – 8192n, *Phaseolus vulgaris* – 4096n, *Phaseolus hystericus* – 4096n) (Nagl 1974) i rozchodnika (*Sedum acre*) – 1024C (Kozieradzka-Kiszkurno, Bohdanowicz 2003). Więcej przykładów czytelnik może znaleźć w pracach Turały (1969, 1979), Rychlewskiego (1969), Bohdanowicza (1987) oraz Łuszczaka i wsp. (2000).

ROLA ENDOREDUPLIKACJI

Pomimo, że zjawisko endoreduplikacji u roślin jest dość częste, jego biologiczna rola nie jest jednoznacznie wyjaśniona. Przyczyny prowadzące do zaistnienia tego procesu przedstawiane są w formie hipotez i można je podzielić na trzy grupy:

- wynikające z budowy genomu,
- funkcjonalne,
- indukowane przez czynniki środowiskowe i stres.

Korelacja pomiędzy wielkością genomu i częstością zjawiska endoreduplikacji została opisana u wielu taksonów. De Rocher i współpracownicy (1990) badali zawartość DNA jądrowego w różnych tkankach u kilkunastu gatunków sukulentów. U dziewięciu taksonów o stosunkowo małych genomach (wartość 2C wynosiła około 3,5 pg DNA) w tkankach stałych stwierdzili wyższe poziomy ploidalności, natomiast nie obserwowali takiego zróżnicowania u dwóch gatunków sukulentów z dużymi genomami (32,0 pg DNA). Także u innych roślin, które posiadają małe genomy (około 1 pg), np. u *Arabidopsis thaliana* (Galbraith et al. 1991),

Cucumis sativus (Gilissen et al. 1993), *Lycopersicon esculentum* (Smulders et al. 1994), *Medicago sativa* i *M. truncatula* (Kondorosi et al. 2000) oraz u *Brassica oleracea* (Kudo, Kimura 2001), w dojrzałych tkankach odnotowano wyższe poziomy ploidalności. Przytoczone informacje wskazują na istnienie negatywnej korelacji pomiędzy rozmiarami genomu a poziomem ploidalności. Być może, do prawidłowego funkcjonowania niektórych tkanek stałych, konieczna jest określona ilość DNA. Taksony o małych genomach, które nie spełniają takiego warunku, w toku ewolucji wykształciły mechanizmy umożliwiające zwielokrotnienie własnego genomu. Przykładem potwierdzającym istnienie zależności między budową genomu a zdolnością do endoreduplikacji jest zachowanie się komórek w hodowlach *in vitro*. Hodowle te prowadzone są w warunkach ściśle kontrolowanych, dlatego można się spodziewać, że otrzymane osobniki będą genetycznie identyczne. Niepożądanym efektem jest zmienność somaklonalna, która przejawia się w stosunku do różnych cech, jak np. zmiany morfologii chromosomów (Joachimik et al. 1995), zwiększenie stopnia ploidalności i inne. Zauważono, że na zmiany ilości DNA szczególnie podatne są tkanki gatunków polisomatycznych. Takie niejednorodne genetycznie tkanki nazywane są miksploidami. Obecnie wiadomo, że endoreduplikacja występuje u różnych organizmów niezależnie od ilości DNA, dlatego w równym stopniu wydają się być prawdopodobne przyczyny omówione poniżej.

W procesie różnicowania się komórek i formowania wysoce wyspecjalizowanych tkanek stałych pierwszorzędowa struktura DNA w zasadzie nie ulega zmianie, ale może się zmieniać jego organizacja i ilość. Obserwowany stały, tkankowo specyficzny wzór endopoliploidyzacji w różnych organach świadczy o istotności tego procesu w przygotowaniu komórek do prawidłowego ich funkcjonowania w obrębie organizmu. Obserwowane różnice w wielkości roślin *Arabidopsis* były kojarzone z różną zdolnością do endoreduplikacji (Vlieghe et al. 2005). W hodowlach *Arabidopsis* linii kontrolnej i zmodyfikowanej genetycznie stwierdzono, że rośliny

transgeniczne, ze zwiększoną aktywnością genu DEL1- inhibitora endoreduplikacji, morfologicznie były podobne do typu dzikiego, ale osiągały mniejsze rozmiary. Wielkość komórek u tych roślin była znacznie mniejsza w porównaniu z roślinami typu dzikiego, natomiast liczba komórek w wybranych organach była porównywalna w obu próbach. Stopień skarlenia był proporcjonalny do poziomu transkrypty genu DEL1. Powyższy przykład i inne (Nagl 1978, Galbraith et al. 1991, Masui 1992, Melaragno et al. 1993, Breuer et al. 2007) wskazują, że rozmiar komórki jest zdeterminowany przez proporcje jądrowo-cytoplazmatyczne. Wpływ ilości DNA na fenotyp określany jest jako efekt nukleotypowy (Bennett 1972, Grime, Mowforth 1982).

Innym przykładem ilustrującym wpływ poziomu ploidalności jądra na morfologię są włoski liściowe i łodygowe u *Arabidopsis*. Epiderma tej rośliny wytwarza rozgałęzione trichomy, które pełnią funkcję obronną poprzez utrudnianie ruchu szkodników po powierzchni rośliny. Typowe włoski zbudowane są z jednej komórki wytwarzającej trzy rozgałęzienia, a jej jądro zawiera 32 C. Liczba rozgałęzień jest uzależniona od poziomu DNA (Hülkamp et al. 1994). U mutantów z upośledzoną endoreduplikacją obserwowano formowanie się nietypowych wielokomórkowych trichomów lub zamieranie komórek (Schnittger et al. 2003). Natomiast u roślin ze mutowanymi genami ograniczającymi liczbę cykli endoreduplikacji powstawały większe włoski i posiadały większą liczbę rozgałęzień (Sako et al. 2010). Obserwacje te wskazują jednoznacznie na kluczową rolę poliploidyzacji w ontogenezie włosków.

W trakcie dojrzewania nasion i owoców zachodzi synteza, polimeryzacja i gromadzenie materiałów w miękiszu spichrzowym. Tempo polimeryzacji odgrywa istotną rolę w gromadzeniu polisacharydów, ponieważ monosacharydy są substancjami osmotycznie czynnymi. Przyspieszenie metabolizmu wymaga większej ilości białek, których synteza pośrednio lub bezpośrednio zależy od transkrypcji. Jednym ze sposobów zwiększania transkrypcji jest zwielokrotnienie liczby alleli danego genu.

Takie zwielokrotnienie materiału genetycznego ma miejsce w dużych komórkach miękiszu spichrzowego (Dhillon, Miksche 1982, Teyssier et al. 2008). W metabolizmie tej tkanki uczestniczy wiele genów, ale na pewno nie wszystkie. Można więc postawić pytanie, dlaczego komórka kopiuje całą lub prawie całą informację genetyczną? Powszechnie przyjmuje się, że cała jej zawartość stanowi materiał zapasowy. W trakcie powtórnego włączania związków organicznych do metabolizmu monomery łącznie z nukleotydami mogą być powtórnie użyte do budowy nowych komórek. Z drugiej strony pojawiają się doniesienia sugerujące, że endoreduplikacji ulega tylko euchromatyna bogata w geny, natomiast frakcja heterochromatynowa jest pomijana w kolejnych rundach (Kondorosi, Kondorosi 2004).

W antypodach, suspensorze i haustoriach obecność jąder poliploidalnych i chromosomów olbrzymich jest kojarzona z funkcjami tych komórek. Antypody uczestniczą w transporcie substancji z chalazy do woreczka zalążkowego, wieszadełko pośredniczy pomiędzy bielmem wtórnym i rozwijającym się zarodkiem. Wiele danych wskazuje, że struktury te są nie tylko biernymi przekazywaczami gotowych produktów. W antypodach zachodzi również intensywna synteza białka, o czym świadczy duża ilość szorstkiego retikulum (Schulz, Jensen 1971, Zhukova, Sokolovskaya 1977). Natomiast z kolei obecność gładkiego retikulum w komórkach suspensora, sugeruje możliwość syntezy między innymi terpenoidów (związków pokrewnych hormonom) (Rodkiewicz et al. 1996).

Tapetum zbudowane jest przeważnie z dwu- lub wielojądrowych komórek. Liczba jąder, stopień ich ploidalności oraz sposób jego zwielokrotnienia jest cechą gatunkową (D'Amato 1984, Pacini 1997, Weiss, Maluszyńska 2001). Komórki tapetum z pobranych substratów syntetyzują materiały odżywcze, hormony roślinne, a następnie wydzielają je do komory mikrosporangium, stymulując w ten sposób procesy mikrosporangogenezy i mikrogametogenezy.

Rośliny często nie posiadają możliwości pozbywania się szkodliwych, końcowych

produktów przemiany materii. Gromadzenie tych substancji w komórce stwarza potencjalne możliwości uszkodzenia DNA, dlatego konieczna jest szybka ich neutralizacja. W toku ewolucji wykształciły systemy ich neutralizacji. Dobrym przykładem jest metabolizm kwasu szczawowego. Jest to substancja osmotycznie czynna, która obniża wartość pH i zostaje zobojętniona w reakcji z dwuwartościowymi jonami, co prowadzi do powstania nierozpuszczalnych soli. W zależności od stopnia uwodnienia krystalizuje w formie pojedynczych kryształów, druzów lub rafidów. U *Vanilla planifolia* komórki wyspecjalizowane w pełnieniu funkcji detoksykacyjnych, gromadzące rafidy są większe od pozostałych i zawierają poliploidalne jądra (Kausch, Horner 1984). Podobne obserwacje dotyczą także innych gatunków roślin. Zwielokrotnienie liczby kopii genów stanowi rodzaj buforu zabezpieczającego przed skutkami mutacji (Inzé, De Veylder 2006), gdyż może zwiększać efektywność procesu transkrypcji i translacji. Rozrost organów w wyniku powiększania objętości komórek jest korzystniejszy dla organizmu niż uzyskanie tego efektu w wyniku podziałów. Ilustruje to porównanie aktywnych procesów zachodzących w obydwu cyklach (Tab. 2).

Endoreduplikacja może być również indukowana czynnikami egzogennymi. Przykładem może być jej obecność w komórkach zaatakowanych przez pasożyty lub w trakcie symbiozy. W obu układach autotroficzna roślina jest dostarczycielem substancji pokarmowych. Zarówno symbiont jak i pasożyt, zmieniają w większym

lub mniejszym stopniu metabolizm i rozwój komórki lub całej tkanki w celu pozyskania potrzebnych materiałów odżywczych. Głównym celem ataku jest przejęcie kontroli nad cyklem komórkowym. O zasięgu tej ingerencji najlepiej świadczy porównanie ekspresji genów w komórkach kontrolnych i olbrzymich u roślin zainfekowanych przez nicienia. Badania przeprowadzone na *Arabidopsis* przy użyciu mikromacierzy wykazały zmianę aktywności 3373 genów (Jammes et al. 2005). Równie duży zakres zmian odnotowano u innych roślin zainfekowanych pasożytami (Bar-Or et al. 2005). Znaczące zmiany ekspresji genów zidentyfikowane na podstawie analizy mikromacierzy były weryfikowane innymi metodami, np. RT-PCR w czasie rzeczywistym (PCR = w czasie rzeczywistym, ang. *real-time PCR*). Zgodnie z przewidywaniami ustalono, że w pierwszej kolejności wyłączone zostają geny wchodzące w skład układu obronnego (Kondorosi, Kondorosi 2004). Następnie przeprofilowana zostaje ekspresja genów cyklu komórkowego i innych. Wśród nich najistotniejsze są te, których produkty uczestniczą w transporcie i wzroście powierzchni ściany komórkowej. Przejęcie kontroli nad transportem zapewnia stały dopływ substratów i produktów koniecznych dla rozwoju patogena lub organizmu symbiotycznego. W procesie powstawania komórek olbrzymich dochodzi do rozpadu dużej wakuoli na wiele mniejszych; w gęstej cytoplazmie pojawia się większa ilość organelli (Jones, Payne 1978). Ściana komórkowa ulega wzrostowi powierzchniowemu lub częściowemu

Tabela 2. Porównanie procesów zachodzących w czasie endoreduplikacji i mitozy (wg Turały-Szybowskiej 1979).

Table 2. Comparison of processes occurring during endoreduplication and mitosis (according to Turała-Szybowska 1979).

Proces <i>Process</i>	Endoreduplikacja <i>Endoreduplication</i>	Cykl mitotyczny <i>Mitotic cycle</i>
Replikacja DNA <i>DNA replication</i>	tak <i>yes</i>	tak <i>yes</i>
Tworzenie wrzeciona podziałowego i fragmoplastu <i>Mitotic spindle and phragmoplast assembly</i>	nie <i>no</i>	tak <i>yes</i>
Cytokineza <i>Cytokinesis</i>	nie <i>no</i>	tak <i>yes</i>
Wzrost powierzchniowy ściany komórkowej <i>Surface growth of the cell wall</i>	tak <i>yes</i>	tak <i>yes</i>

rozpuszczeniu i wówczas dochodzi do fuzji komórek (Jones et al. 1998).

Cytogenetyczne skutki pasożytnictwa przedstawione zostały na przykładzie zależności rośliny – nicienia. Nicienie z rodziny *Heteroderidae* (mątwikowate) są obligatoryjnymi wewnętrznymi pasożytami wielu roślin uprawnych. Larwy żyjące w glebie rozpoznają i wędrują w kierunku korzeni żywiciela. Robaki te wyposażone są w dwie specjalne struktury: cienką pustą w środku sondę oraz trzy jednokomórkowe gruczoły zlokalizowane w przełyku (Hussey 1989, Hussey, Mims 1990). W fazie infekcji przy ich pomocy zostaje rozpuszczona i przebita ściana komórkowa (Williamson, Hussey 1996). Wewnątrz korzenia poprzez tkanki miękkiszowe larwy przemieszczają się w kierunku stożka wzrostu, a następnie wiązką przewodzącą w kierunku przeciwnym. Po opuszczeniu wiązki osiedlają się na stałe w komórkach miękkiszowych i przy pomocy produkowanych wydzielin przejmują kontrolę nad aktywnością genów żywiciela. Inhibicja genów odpowiedzialnych za formowanie się fragmoplastu prowadzi do powstania komórczaków. Zainfekowane przez nicienie komórki posiadały nawet po sto jąder, z których niektóre zawierały więcej niż 4C DNA (Williamson, Hussey 1996). Zwielokrotnienie liczby genów w komórce i całkowite ich podporządkowanie pasożytnictwu umożliwia jego rozwój i programowanie wzrostu komórki żywiciela. Efektem makroskopowym zakażenia nicieniami są narośla (galasy) na korzeniach (Williamson, Hussey 1996).

Symbioza pomiędzy roślinami motylkowymi i bakteriami azotowymi jest procesem wieloetapowym. Przyszłe organizmy symbiotyczne rozpoznają się za pomocą sygnałów chemicznych. Rośliny poprzez korzenie wydzielają związki flawonoidowe, które są atraktantami dla zgodnych mikrosymbiontów, natomiast trujące dla innych bakterii. Wchodzące w skład tej wydzieliny białka regulatorowe indukują ekspresję bakteryjnych genów *nod*. Czynniki NOD (chitolipooligosacharydy) powoduje zamieranie włóśników, wyłączenie roślinnych mechanizmów obronnych, a inicjuje powstanie merystemów dających

początek brodawkom. Kolejnym etapem jest zainfekowanie powstałych brodawek przez bakterie azotowe. W obrębie funkcjonalnej brodawki wyróżniono trzy strefy. Zewnętrzna jest zbudowana z tkanki merystematycznej. Druga, położona głębiej, to strefa infekcyjna. Bakterie znajdujące się w tym obszarze w sposób ciągły produkują czynnik NOD. Komórki tej strefy nie dzielą się, a zachodzą w nich kolejne procesy replikacji DNA i w efekcie powstają duże jądra o zawartości do 64C, a proporcjonalnie wrasta także objętość komórek. Trzecia strefa zbudowana jest z dużych komórek i w niej następuje wiązanie azotu (Kondorosi, Kondorosi 2004). Przytoczone obserwacje sugerują, że endoreduplikacja inicjowana przez czynnik egzogeny jest istotnym etapem w przygotowaniu komórek kory pierwotnej korzenia roślin motylkowych do symbiozy z *Rhizobium radicicola*. Nie jest to jedyna droga prowadząca do inicjowania endoreduplikacji w korzeniach roślin z rodziny *Papilionaceae*. U niektórych przedstawicieli tego taksonu, np. u koniczyny i lucerny, opisano tzw. pseudobrodawki. Ich budowa histologiczna jest taka sama jak typowych brodawek. Różnice wynikały z obecności licznych ziaren skrobi i braku bakterii azotowych w pseudobrodawkach (Blauenfeldt et al. 1994). Spontaniczne pojawianie się pseudobrodawek w korzeniach stawia pod znakiem zapytania rolę czynnika NOD w indukowaniu zmian morfologicznych i fizjologicznych w komórkach kory pierwotnej korzenia. Porównując cytowane powyżej doniesienia (Blauenfeld et al. 1994, Kondorosi, Kondorosi 2004) nie można jednoznacznie rozstrzygnąć, czy w brodawkach korzeniowych endoreduplikacja jest inicjowana przez bodźce endo- czy egzogenne. W świetle dotychczasowych badań nad endoreduplikacją wydaje się, że mechanizm uruchamiający ten proces jest pod kontrolą organizmu roślinnego, natomiast pasożyty i symbionty „złamały szyfr”, który pozwala go uruchomić w sposób niezależny od gospodarza.

Endoreduplikacja może być również czynnikiem umożliwiającym adaptację do warunków stresowych. Już w latach sześćdziesiątych

ubiegłego wieku zaobserwowano, że w jądrach komórek kory pierwotnej korzeni u *Lobularia maritima* i *Bryophyllum crenatum* hodowanych w wodzie morskiej następowało zwielokrotnienie zawartości DNA (Catarino 1965). Późniejsze, bardziej rozbudowane metodycznie eksperymenty wykazały, że zdolność do przeprowadzenia endoreduplikacji jest konieczna do przeżycia w warunkach stresu solnego. Doświadczenie przeprowadzono na dwóch liniach *Sorghum bicolor*, różniących się zdolnościami do endoreduplikacji. Hodowano je w roztworze o stężeniu 150mM NaCl przez trzy tygodnie. Stres przeżyły tylko rośliny o genotypach umożliwiających przejście kilku rund endoreduplikacji. U tych roślin w 41% komórek kory pierwotnej strefy włośnikowej stwierdzono zawartość DNA wyższą niż 4C, podczas gdy w próbie kontrolnej wartość ta wynosiła 1,3% (Ceccarelli et al. 2006).

W jądrach komórkowych miększu asymilacyjnego u roślin realizujących metabolizm CAM stwierdzono zwielokrotnioną zawartość DNA (De Rocher et al. 1990). Rośliny CAM ze względu na warunki środowiskowe (wysoka temperatura, brak wody, niedostępność CO₂, itp.) otwierają szparki i pobierają dwutlenek węgla głównie w nocy. Brak światła uniemożliwia przeprowadzenie fotosyntezy, dlatego też CO₂ jest przejściowo magazynowany w formie związków pośrednich. Tempo i ilość zmagazynowanego dwutlenku węgla w kwasach karboksylowych decyduje o efektywności fotosyntezy. Zwiększenie liczby kopii genów może być interpretowane z jednej strony jako sposób zabezpieczenia informacji genetycznej przed czynnikami kancerogennymi, a z drugiej jako zabieg w kierunku zwiększenia tempa transkrypcji i translacji w celu przyspieszenia niektórych procesów metabolicznych.

WPŁYW ŚWIATŁA NA ENDOREDUPLIKACJĘ

Dwukrotnie wyższy stopień ploidalności, większe rozmiary komórek w epikotylu *Pisum sativum* i hipokotylu *Arabidopsis thaliana*

stwierdzono u roślin hodowanych w ciemności (Gendreau et al. 1997, 1998). Sygnały świetlne odbierane są przez barwniki fotomorfogenetyczne, takie jak: fitochrom, który pochłania czerwień i daleką czerwień, kryptochrom, który pochłania niebieski i UV-A oraz fototropiny wrażliwe na promienie niebieskie i UV-B. Każdy z tych receptorów wymagany jest do jednego lub kilku procesów fotomorfogenezy, np. wysokość łodygi i liczba tworzonych rozgałęzień zależą od długości fali świetlnej (Moe, Heins 1990). Liście pomidorów (Smulders et al. 1994) i ziemniaków (Uijtewaal 1987) uprawianych pod szkłem, wykazały wyższy stopień ploidalności w odniesieniu do kontrolnych upraw polowych. W hodowli *in vitro* somatycznych zarodków storczyka *Doritaenopsis*, regenerowanych z kilku tkanek, zastosowano różne kombinacje oświetlenia. Po zastosowaniu łącznie oświetlenia czerwonego i dalekiej czerwieni stwierdzono najmniejszą ilość poliploidalnych komórek (Park et al. 2010). Uzyskane dane wskazują, że taka kombinacja światła pobudza embriogenezę somatyczną u *Doritaenopsis* i hamuje endoreduplikację. Poziom endoreduplikacji zależy od natężenia i jakości światła, jednak ostateczny efekt uwarunkowany jest wieloma czynnikami endogennymi i innymi egzogennymi.

PODŁOŻE MOLEKULARNE

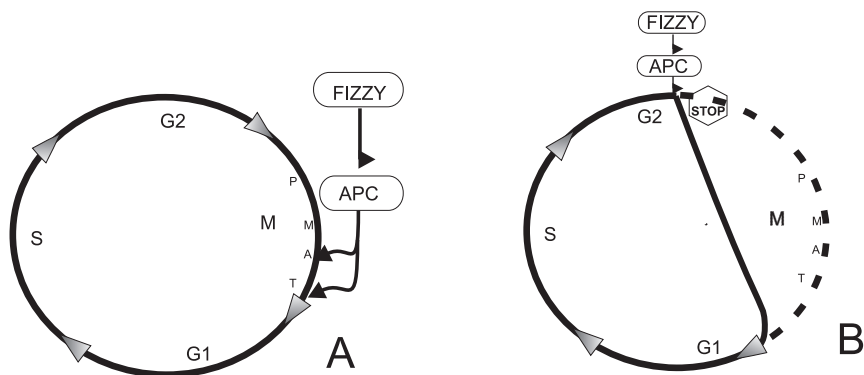
Mitotyczny cykl komórkowy i endoreduplikacja są kontrolowane przez kompleksy CDK (Weiss et al. 1998, Roudier et al. 2003). Choć podstawy molekularne dla obu procesów są częściowo wspólne, to jednak wzajemnie się wykluczają. Strategia rozwojowa organizmu precyzyjnie decyduje, kiedy i w jakich komórkach lub tkankach jeden z nich będzie aktywny, a drugi zostanie zatrzymany. Pomimo, że zjawisko endoreduplikacji stanowi przedmiot zainteresowania wielu specjalistów z zakresu cytologii, genetyki czy biochemii, do tej pory nie został opracowany uniwersalny model wyjaśniający inicjację i przebieg tego procesu. Poważną trudność stanowi brak jednolitego

nazewnictwa (np. cykliny o podobnym lub takim samym działaniu inaczej nazywane są u drożdży, człowieka i roślin) i jasnych kryteriów ich klasyfikacji (Wang et al. 2004, Nieuwland et al. 2009). Dane pozyskiwane są dwoma sposobami. Jednym z nich jest analiza fenotypu organizmów, u których występują zmutowane geny uczestniczące w cyklu mitotycznym i endoreduplikacji. Inny sposób stanowią badania biochemiczne pozwalające na określenie zmian w ilości, jakości i aktywności białek w komórkach podczas przechodzenia z cyklu mitotycznego do endoreduplikacji. Zdarzenia decydujące o skuteczności tego przełączenia dokonują się w fazie G₂. W cyklu mitotycznym w fazie G₂, komórka bezpośrednio przygotowuje się do kolejnego podziału. Natomiast przejście do endoreduplikacji wymaga zatrzymania syntezy i degradacji czynników promujących mitozę. Analizy wykonane na ewolucyjnie odległych organizmach ujawniły przedwczesną aktywność enzymów degradujących cykliny mitotyczne, a tym samym spadek ilości cyklin mitotycznych A i B i pojawienie się nowych białek markerowych dla endoreduplikacji (Edgar, Lehner 1996). Wielopoziomowa regulacja aktywności białek uczestniczących w cyklu komórkowym wymaga zaangażowania dużej liczby związków chemicznych. W modelowej roślinie *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano kilkadziesiąt cyklin i dużą grupę białek

o podobnym działaniu (Wang et al. 2004). Należy jeszcze uwzględnić białka regulujące aktywność heterodimerów CDK/cyklina (De Veylder et al. 2001, Schnittger et al. 2003) i ligazy odpowiedzialne za proces ubiquitylizacji białek uczestniczących w cyklu komórkowym (Verkest et al. 2005). Tworzą one łącznie różne kombinacje, które uruchamiają kaskadowe reakcje fosforylacji i defosforylacji białek aktywnych w określonych fazach cyklu komórkowego (Inzé, De Veylder 2006).

DEGRADACJA CYKLIN MITOTYCZNYCH PRZY UDZIALE APC

APC (ang. *anaphase promoting complex*), czyli kompleks indukujący anafazę, cyklisom, jest to wielojednostkowy kompleks białkowy pełniący funkcję ligazy ubiquitynowej. Jego aktywność jest precyzyjnie regulowana. W mitozie jej szczyt przypada na przejście z metafazy do anafazy i pod koniec kariokinezy. W tych fazach przeprowadza on ubiquitylizację cyklin mitotycznych i ich degradację w proteosomach (Harper et al. 2002). Jest to warunek konieczny do wejścia komórki w fazę G₁ następnego cyklu komórkowego. Aktywność APC zależy od obecności czynników regulatorowych. Jednym z takich regulatorów opisanym u *Medicago* (Cebolla et al. 1999) jest białko nazwane CCS52,



Ryc. 2. Aktywność APC w cyklu mitotycznym (A) i w inicjacji endoreduplikacji (B), opis w tekście (na podstawie Joubès, Chevalier 2000).

Fig. 2. APC activity in mitotic cycle (A) and initiation of endoreduplication (B). Detailed description in text (basis of Joubès, Chevalier 2000).

zbudowane z 475 aminokwasów. Sekwencja aminokwasów, struktura i funkcja CCS52 jest porównywalna z białkiem AtCCS52 u *Arabidopsis thaliana*, z FZR u *Drosophila melanogaster* (Sigrist, Lehner 1997), z SRW1/STE9 u *Saccharomyces pombe* (Yamaguchi et al. 1997, Kitamura et al. 1998), HCT1/CDH1 u *Saccharomyces cerevisiae* (Schwab et al. 1997) i z innymi FZR/CDH1 obecnymi u zwierząt i człowieka. Potranskrypcyjna aktywność regulatorów APC może być modelowana przez fosforylację albo degradację (Zachariae et al. 1998). Przejście z cyklu mitotycznego do endoreduplikacji związane jest z czasem pojawienia się aktywatorów APC (Ryc. 2). Obecność tych białek w fazie G₂ powoduje zahamowanie podziałów i rozpoczęcie procesu endoreduplikacji (Graf, Larkins 1995).

DEGRADACJA CYKLIN MITOTYCZNYCH PRZY UDZIALE INNYCH BIAŁEK

U *Drosophila*, w komórkach w których zachodzi endoreduplikacja, cykliny E pojawiają się wielokrotnie, ale przez krótki okres czasu. Ich obecność prawdopodobnie jest konieczna dla zainicjowania kolejnej rundy replikacji. W tych komórkach nie występują mitotyczne cykliny A i B, natomiast zostało zidentyfikowane białko *fizzy related*, odpowiedzialne za degradację cyklin mitotycznych (Dawson et al. 1993). Obecność tego białka po zakończeniu replikacji uniemożliwia rozpoczęcie mitozy, a jednocześnie warunkuje rozpoczęcie endoreduplikacji (Sigrist, Lehner 1997). U zwierząt, roślin, a także u niższych eukariotów, zostały opisane homologiczne białka (Weinstein et al. 1994, Schwab et al. 1997). Inhibitory cyklin mitotycznych w literaturze zostały oznaczone symbolem CKI. U *Arabidopsis*, w komórkach, w których zachodzi endoreduplikacja, zidentyfikowano dwa tego typu inhibitory oznaczone symbolem ICK1/KRP1 (Schnittger et al. 2003) i KRP2 (Verkest et al. 2005). Jest to duża grupa białek, która wchodzi w reakcje z cyklina A i B, hamuje ich aktywność do poziomu uniemożliwiającego rozpoczęcie mitozy i równocześnie zapoczątkowuje endoreduplikację. Poziom tych

białek wydaje się być skorelowany ze stopniem ploidalności (Schnittger et al. 2003).

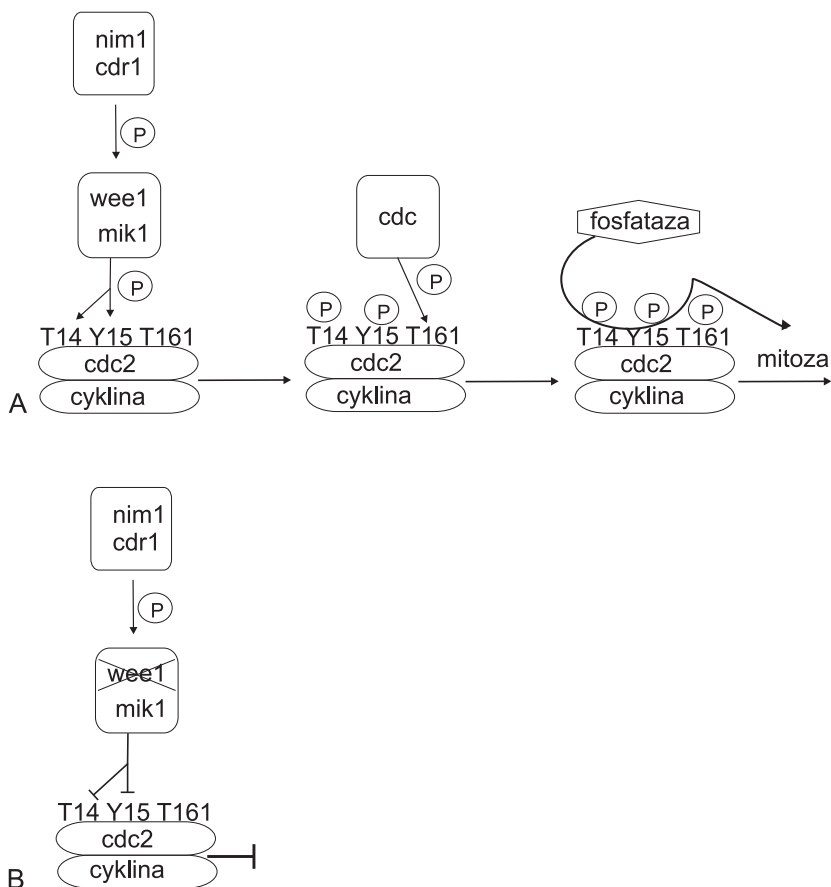
ROLA KINAZY WEE1 W INICJACJI ENDOREDUPLIKACJI

Maksymalna aktywność kinazy Wee1 podobnie jak Mik1 jest notowana pod koniec fazy G₂. Białka te uczestniczą w fosforylacji kinazy p34^{cdc2} połączonej z cykliną mitotyczną w dwóch specyficznych miejscach: tyrozynie 15 (Y15) i treoninie 14 (T14) (Pines 1995). Fosforylacja tych aminokwasów hamuje wejście komórek w mitozę. Kinazy Wee1 i Mik1 działają jako mitodepresory (Feilott et al. 1991), ale jednocześnie fosforylacja Y15 i T14 jest warunkiem koniecznym do kolejnej fosforylacji treoniny 161 przez inną kinazę (Ryc. 3). Zapewnia to maksymalną aktywację kompleksu kinaza p34^{cdc2}/cyklina B w czasie mitozy. Transgeniczne rośliny pomidorów z obniżoną ekspresją genu *Wee1* były karłowate, wytwarzały małe owoce i posiadały inne niekorzystne cechy. Zmiany morfologiczne skorelowane były z mniejszymi rozmiarami komórek i niższym stopniem ploidalności jąder w stosunku do dzikiej linii. Tak więc, obniżona aktywność genu *Wee1* może być traktowana jako inhibitor endoreduplikacji.

UDZIAŁ TOPOIZMERAZY VI W KOLEJNYCH RUNDACH ENDOREDUPLIKACJI

Topoizomerazy są to enzymy odpowiedzialne za przecinanie i odtwarzanie wiązań fosfodiesterowych w polinukleotydowych łańcuchach DNA. W procesie replikacji, transkrypcji i rekombinacji ułatwiają rozkręcanie spirali DNA. Topoizomeraza II wraz z innymi białkami uczestniczy w rozdzieleniu chromatyd siostrzanych w czasie mitozy (Giménez-Abián et al. 1995, Sumner 1998), a topoizomeraza VI jest aktywna w procesie crossing over (Bergerat et al. 1997, Nichols et al. 1999, Corbett, Berger 2003b).

Aktywność poszczególnych typów topoizomeraz w kolejnych rundach replikacji, została opracowana na podstawie obserwacji zmian



Ryc. 3. Fosforylacja kompleksu cyklina mitotyczna i kinaza cdc2 przez kinazy Wee1 i Mik1 jest jednym z etapów prowadzącym do rozpoczęcia mitozy (A). Mutacje w genie kodującym kinazę Wee1 blokują rozpoczęcie mitozy, ale stwarzają warunki do zaistnienia endoreduplikacji (B) (Deckert 2000, zmienione).

Fig. 3. The phosphorylation of mitotic cdc2/cyclin complex by the Wee kinase and Mik1 kinase is one of several of step leading to triggered of mitotic cycle (A). When mutation in gene which encoded Wee1 kinase triggered mitosis arrest through the degradation of mitotic cyclin which was followed by endoreduplication (B) (Deckert 2000, to change).

fenotypowych mutantów z zablokowaną ich aktywnością. Inhibitory topoizomerazy II wykorzystywane są między innymi do leczenia nowotworów u ssaków. Inhibitory topoizomeraz podzielono na dwie kategorie. Pierwsze to klasyczne inhibitory, które trwale łączą enzym z przeciętą nicią DNA i najczęściej prowadzą do śmierci komórki (Liu 1989, Chen, Liu 1994, Froehlich-Ammon, Osheroff 1995), nie są one użyteczne w badaniach nad endoreduplikacją. Drugą grupę stanowią czynniki określane jako nieklasyczne inhibitory. Podstawy molekularne ich działania nie są poznane (Boritzki et al.

1988, Jensen et al. 1990, Utsumi et al. 1990, Bojanowski et al. 1993, Chen, Beck 1993, Jensen et al. 1994). Po podaniu specyfiku zaliczanego do drugiej kategorii, w niektórych komórkach zaobserwowano jądra o zwiększonej do 8C zawartości DNA (Jensen et al. 1990, Andoh, Ishida 1998). Zastosowane w tych pracach inhibitory prawdopodobnie uniemożliwiły topoizomerazie II rozdział chromatyd, ale nie hamowały jej aktywności w kolejnej rundzie replikacji. Z kolei w jądrach komórkowych zawierających powyżej 8C DNA stwierdzono obecność topoizomerazy VI.

Topoizomeraza VI została odkryta u archeobakterii *Sulfolobus shibatae* i była uznawana za enzym specyficzny dla tego podkrólestwa. Jednak kilka lat temu w modelowej roślinie *Arabidopsis thaliana* znaleziono białko homologiczne do archeobakteryjnej topoizomerazy VI (Corbett, Berger 2003a). Jest to heterotetramer złożony z trzech podjednostek A: topo VI-A Spo11A (At SPO11-1, At SPO11-2 i At SPO11-3) oraz podjednostki B At TOP6B, odpowiedzialnej za hydrolizę ATP (Hartung et al. 2002). Mutacje w genach kodujących podjednostkę B (At TOP6B) lub podjednostkę A – At SPO11-3 skutkowały karłowatym fenotypem. Badania histologiczne wykazały, że tkanki u zmutowanych roślin zbudowane są z mniejszych komórek, włoski były wielokomórkowe i tworzyły mniej rozgałęzień. Zawartość DNA u form zmutowanych nie przekraczała 8C, podczas gdy u form dzikich poziom DNA był znacznie wyższy (Hartung et al. 2002, Sugimoto-Shirasu et al. 2002, Yin et al. 2002).

Analiza wyników eksperymentów przeprowadzonych w wielu różnych pracowniach, pozwala na zaproponowanie następującego udziału poszczególnych topoizomeraz w kolejnych rundach endoreduplikacji. Jeżeli topoizomeraza II ma zablokowaną aktywność mitotyczną, może uczestniczyć w kolejnej fazie S, w wyniku której powstaną jądra o zawartości 8C. W tym momencie udział tego enzymu zostaje zakończony, a dalsze rundy endoreduplikacji mogą zachodzić tylko przy udziale topoizomerazy VI, z aktywnymi podjednostkami: B – At TOP6B i A – At SPO11-3.

PODSUMOWANIE

Endoreduplikacja jest procesem prowadzącym do powstania komórek o zwielokrotnionej zawartości jądrowego DNA. Wielokrotnie powtarzające się cykle replikacyjne prowadzą do powstania komórek o zawartości 8C, 16C, 32C itd. DNA. Aby to było możliwe, konieczne jest wyłączenie mechanizmów prowadzących do mitozy. Zmiany te mają miejsce w różnych fazach cyklu komórkowego i dotyczą wielu białek. U licznych roślin okrytozalążkowych

endoreduplikacja jest zjawiskiem stałym w procesie różnicowania niektórych tkanek, może być także traktowana jako czynnik adaptacyjny do zmieniających się warunków środowiska.

LITERATURA

- ANDOH T., ISHIDA R. 1998. Catalytic inhibitors of DNA topoisomerase II. *Biochim. Biophys. Acta* **1400**: 155–171.
- BARLOW P. W. 1975. The polytene nucleus of the giant hair cell of *Bryonia* anthers. *Protoplasma* **83**(4): 339–349.
- BAR-OR C., KAPULNIK Y., KOLTAI H. 2005. A broad characterization of the transcriptional profile of the compatible tomato response to the plant parasitic root knot nematode *Meloidogyne javanica*. *European Journal of Plant Pathology* **111**: 181–192.
- BENNETT M. 1972. Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* **181**: 109–135.
- BERGERAT A., DE MASSY B., GADELLE D., VAROUTAS P. C., NICOLAS A., FORTERRER P. 1997. An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* **386**: 414–417.
- BLAUENFELDT J., JOSHI P. A., GRESSHOFF P. M., CAETANO-ANOLLÉS G. 1994. Nodulation of white clover (*Trifolium repens*) in the absence of *Rhizobium*. *Protoplasma* **179**: 106–110.
- BOHDANOWICZ J. 1987. *Alisma* embryogenesis: the development and ultrastructure of the suspensor. *Protoplasma* **137**: 71–83.
- BOJANOWSKI K., FILHOL O., COCHET C., CHAMBAZ E. M., LARSEN A. K. 1993. DNA topoisomerase II and casein kinase II associate in a molecular complex that is catalytically active. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 22920–22926.
- BRODSKY W. Y., URYVAEVA I. V. 1977. Cell polyploidy; its relation to tissue growth and function. *International Review of Cytology* **50**: 275–332.
- BORITZKI T. J., WOLFARD T. S., BESSERER J. A., JACKSON R. C., FRY D. W. 1988. Inhibition to type II topoisomerase by fostriecin. *Biochemical Pharmacology* **37**: 4063–4068.
- BREUER C., STACEY N. J., WEST C. E., ZHAO Y., CHORY J., TSUKAYA H., AZUMI Y., MAXWELL A., ROBERTS K., SUGIMOTO-SHIRASU K. 2007. BIN4, a novel component of the plant DNA topoisomerase VI complex, is required for endoreduplication in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**: 3655–3668.
- CATARINO F. M. 1965. Salt water, a growth inhibitor causing endopolyploidy. *Portugaliae Acta Biologica Ser. A* **9**: 131–152.

- CEBOLLA A., VINARDELL J. M., KISS E., OLAH B., ROUDIER F., KONDOROSI A., KONDOROSI E. 1999. The mitotic inhibitor *ccs52* is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. *The EMBO Journal* **18**: 4476–4484.
- CECCARELLI M., SANTANTONIO E., MARMOTTINI F., AMZALLAG G. N., CIONINI P. G. 2006. Chromosome endoreduplication as a factor of salt adaptation in *Sorghum bicolor*. *Protoplasma* **227**: 113–118.
- CHEN A. I., LIU L. F. 1994. DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **34**: 191–218.
- CHEN M., BECK W. T. 1993. Teniposide-resistant CEM cells, which express mutant DNA topoisomerase II α , when treated with non-complex-stabilizing inhibitors of the enzyme, display no cross-resistance and reveal aberrant functions of the mutant enzyme. *Cancer Research* **53**: 5946–5953.
- CORBETT K. D., BERGER J. M. 2003a. Emerging roles for plant topoisomerase VI. *Chemistry and Biology* **10**: 107–111.
- CORBETT K. D., BERGER J. M. 2003b. Structure of the topoisomerase VI-B subunit: Implications for type II topoisomerase mechanism and evolution. *The EMBO Journal* **22**: 151–163.
- D'AMATO F. 1964. Endopolyploidy as a factor in plant tissue development. *Caryologia* **17**: 41–52.
- D'AMATO F. 1984. Role of polyploidy in reproductive organs and tissues. W: B. M. JOHRI (ed.), *Embryology of angiosperms*. Springer Verlag, Berlin [et al.], s. 519–566.
- DAWSON I. A., ROTH S., AKAM M., ARTAVANIS-TSAKONAS S. 1993. Mutations of the fuzzy locus cause metaphase arrest in *Drosophila melanogaster* embryos. *Development* **117**: 359–376.
- DE ROCHER E. J., HARKINS K. R., GALBRAITH D. W., BOHNERT H. 1990. Developmentally regulated systemic endopolyploidy in succulents with small genomes. *Science* **250**: 99–101.
- DE VEYLDER L., BEECKMAN T., BEEMSTER G. T., KROLS L., TERRAS F., LANDRIEU I., VAN DER SCHUEREN E., MAES S., NAUDITS M., INZÉ D. 2001. Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 1653–1668.
- DECKERT J. 2000. Regulacja genów cyklu komórkowego roślin. Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań. [w opisie Ryc. 3]
- DHILLON S. S., MIKSCHÉ J. P. 1982. DNA content and heterochromatin variations in various tissues of peanut (*Arachis hypogaea*). *Amer. J. Bot.* **69**: 219–226.
- DOSIER L., RIOPEL J. 1978. Origin, development, and grmh of differentiating trichoblasts in *Elodea canadensis*. *Amer. J. Bot.* **65**: 813–832.
- EDGAR B. A., LEHNER C. F. 1996. Developmental control of cell cycle regulators: a fly's perspective. *Science* **274**: 1646–1652.
- EDGAR B. A., ORR-WEAVER T. L. 2001. Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell* **105**: 297–306.
- FEILLOTTER H., NURSE P., YOUNG P. G. 1991. Genetic and molecular analysis of *cdr1/nim1* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **127**: 309–318.
- FROELICH-AMMON S. J., OSHEROFF N. 1995. Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 21429–21432.
- GALBRAITH D. W., HARKINS K. R., KNAPP S. 1991. Systemic endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **96**: 985–989.
- GENDREAU E., HOFTE H., GRANDJEAN O., BROWN S., TRAAS J. 1998. Phytochrome controls the number of endoreduplication cycles in the *Arabidopsis thaliana* hypocotyl. *Plant Journal* **13**: 221–230.
- GENDREAU E., TRAAS J., DESNOS T., GRANDJEAN O., CABOCHE M., HÖFTE H. 1997. Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **114**: 295–305.
- GILISSEN L. J. W., VAN STAVEREN M. J., CREEMERS-MOLENAAR J., VERHOEVEN H. A. 1993. Development of polysomaty in seedlings and plants of *Cucumis sativus* L. *Plant Science* **91**: 171–179.
- GIMÉNEZ-ABIÁN J. F., CLARKE D. J., MULLINGER A. M., DOWNES C. S., JOHNSON R. T. 1995. A postprophase topoisomerase II-dependent chromatid core separation step in the formation of metaphase chromosomes. *Journal of Cell Biology* **131**: 7–17.
- GRAFI G., LARKINS B. A. 1995. Endoreduplication in maize endosperm: involvement of M phase-promoting factor inhibition and induction of S phase-related kinases. *Science* **269**: 1262–1264.
- GRIME J., MOWFORTH M. 1982. Variation in genome size: an ecological interpretation. *Nature* **299**: 151–153.
- HARPER J. W., BURTON J. L., SOLOMON M. J. 2002. The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes & Development* **16**: 2179–2206.
- HARTUNG F., ANGELIS K. J., MEISTER A., SCHUBERT I., MELZER M., PUCHTA H. 2002. An archaeobacterial topoisomerase homolog not present in other eukaryotes is indispensable for cell proliferation of plants. *Current Biology* **12**: 1787–1791.
- HASITSCHKA-JENSCHKE G. 1957. Die Entwicklung der Samenanlagen von *Allium ursinum* mit besonderer Berücksichtigung der endopolyploiden Kerne in Synergiden und Antipoden. *Österreichische Botanische Zeitschrift* **104**: 1–24.
- HÜLSKAMP M., MISERA S., JÜRGENS G. 1994. Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis*. *Cell* **76**: 555–566.

- HUSSEY R. S. 1989. Disease-inducing secretions of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* **27**: 123–141.
- HUSSEY R. S., MIMS C. W. 1990. Ultrastructure of esophageal glands and their secretory granules in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Protoplasma* **156**: 9–18.
- INZÉ D., DE VEYLDER L. 2006. Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genetics* **40**: 77–105.
- JACQMARD A., DE VEYLDER L., SEGERS G., DE ALMEIDA-ENGLER J., BERNIER G., VAN MONTAGU M., INZÉ D. 1999. Expression of CKS1At in *Arabidopsis thaliana* indicates a role for the protein in both the mitotic and the endoreduplication cycle. *Planta* **207**: 496–504.
- JAMMES F., LECOMTE P., DE ALMEIDA-ENGLER J., BITTON F., MARTIN-MAGNIETTE M. L., RENOU J. P., ABAD P., FAVERY B. 2005. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **44**: 447–458.
- JANKUN A. 1970. Studies in endosperm development of *Delphinium kotulae* Pawł. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica* **13**: 51–64.
- JANKUN A. 1973. Further studies in the development of hybrid endosperm in representatives of the genus *Delphinium* L. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica* **16**: 215–225.
- JENSEN P. B., SORESENSEN B. S., DEMANT E. J. F., SEHESTED M., JENSEN P. S., VINDELLOV L., HANSEN H. H. 1990. Antagonistic effect of aclarubicin on the cytotoxicity of etoposide and 4'-(9-acridinylamino)methanesulfon-*m*-anisidide in human small cell lung cancer cell lines and on topoisomerase II-mediated DNA cleavage. *Cancer Research* **50**(11): 3311–3316.
- JENSEN P. B., SORESENSEN B. S., SEHESTED M., GRUE P., DEMANT E. J. F., HANSEN H. H. 1994. Targeting the cytotoxicity of topoisomerase II-directed epipodophyllotoxins to tumor cells in acidic environments. *Cancer Research* **54**: 2959–2963.
- JOACHIMIAK A., ILNICKI T., KOWALSKA A., PRZYWARA L. 1995. Chromosome alterations in tissue culture cells of *Allium fistulosum*. *Genetica* **96**: 191–198.
- JONES M. G. K., PAYNE H. L. 1978. Early stages of nematode-induced giant cell formation in roots of *Impatiens balsamina*. *Journal of Nematology* **10**: 70–84.
- JONES W. E., KUEHNLE A. R. 1998. Ploidy identification using flow cytometry in tissues of *Dendrobium* species and cultivars. *Lindleyana* **13**: 11–18.
- JONES W. E., KUEHNLE A. R., ARUMUGANATHAN K. 1998. Nuclear DNA content of 26 orchid (Orchidaceae) genera with emphasis on *Dendrobium*. *Annals of Botany* **82**: 189–194.
- JOUBÈS J., CHEVALIER C. 2000. Endoreduplication in higher plants. *Plant Molecular Biology* **43**: 735–745.
- KAUSCH A., HORNER H. 1984. Increased nuclear DNA content in raphide crystal idioblasts during development in *Vanilla planifolia* L. (Orchidaceae). *Eur. J. Cell Biol.* **33**: 7–12.
- KINOSHITA I., SANBE A., YOKOMURAZ E. I. 1991. Increases in nuclear DNA content without mitosis in benzyladenine-treated primary leaves of intact and decapitated bean plants. *J. Exp. Bot.* **42**: 667–672.
- KITAMURA K., MAEKAWA H., SHIMODA C. 1998. Fission yeast Ste9, a homolog of Hct1/Cdh1 and Fizzy-related, is a novel negative regulator of cell cycle progression during G1-phase. *Molecular Biology of the Cell* **9**: 1065–1080.
- KONDOROSI E., KONDOROSI A. 2004. Endoreduplication and activation of the anaphase-promoting complex during symbiotic cell development. *FEBS Letters* **567**: 152–157.
- KONDOROSI E., ROUDIER F., GENDREAU E. 2000. Plant cell-size control: growing by ploidy? *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 488–492.
- KOWLES R., PHILLIPS R. 1985. DNA amplification patterns in maize endosperm nuclei during kernel development. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **82**: 7010–7014.
- KOZIERADZKA-KISZKURNO M., BOHDANOWICZ J. 2003. *Sedum acre* embryogenesis: polyploidization in the suspensor. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* **45** suppl. 2: 153–157.
- KUDO N., KIMURA Y. 2001. Flow cytometric evidence for endopolyploidization in cabbage (*Brassica oleracea* L.) flowers. *Sexual Plant Reproduction* **13**: 279–283.
- KUDO N., KIMURA Y. 2002. Nuclear DNA endoreduplication during petal development in cabbage: relationship between ploidy levels and cell size. *J. Exp. Bot.* **53**: 1017–1023.
- LEMONTEY C., MOUSSET-DECLAS C., MUNIER-JOLAIN N., BOUTIN J. P. 2000. Maternal genotype influences pea seed size by controlling both mitotic activity during early embryogenesis and final endoreduplication level/cotyledon cell size in mature seed. *J. Exp. Bot.* **51**: 167–175.
- LEVAN A. 1939. Cytological phenomena connected with the root swelling caused by growth substances. *Hereditas* **25**: 87–96.
- LIU L. F. 1989. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annual Review of Biochemistry* **58**: 351–375.
- ŁUSZCZAK D., ŚWIERCZYŃSKA J., BOHDANOWICZ J. 2000. Polyploidization of suspensor basal cell in *Triglochin maritimum* L. (Juncaginaceae). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* **42/1**: 131–137.
- MASUI Y. 1992. Towards understanding the control of the division cycle in animal cells. *Biochemistry and Cell Biology* **70**: 920–945.

- MELARAGNO J. E., MEHROTRA B., COLEMAN A. W. 1993. Relationship between endopolyploidy and cell-size in epidermal tissue of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **5**: 1661–1668.
- MOE R., HEINS R. D. 1990. Control of plant morphogenesis and flowering by light quality and temperature. *Acta Horticulturae* **272**: 81–89.
- NAGL W. 1974. The *Phaseolus* suspensor and its polytene chromosomes. *Z. Pflanzenphysiol.* **73**: 1–44.
- NAGL W. 1976. DNA endoreduplication and polyteny understood as evolutionary strategies. *Nature* **261**: 614–645.
- NAGL W. 1978. Endopolyploidy and polyteny in differentiation and evolution. Elsevier, Amsterdam.
- NICHOLS M. D., DE ANGELIS K., KECK J. L., BERGER J. M. 1999. Structure and function of an archaeal topoisomerase VI subunit with homology to the meiotic recombination factor Spo11. *The EMBO Journal* **18**: 6177–6188.
- NIEUWLAND J., SCOFIELD S., MURRAY J. 2009. Control of division and differentiation of plant stem cells and their derivatives. *Developmental Biology* **20**: 1134–1142.
- PACINI E. 1997. Tapetum character states: analytical keys for tapetum types and activities. *Canadian Journal of Botany* **75**: 1448–1459.
- PARK S. Y., YEUNG E. C., PAEK K. Y. 2010. Endoreduplication in *Phalaenopsis* is affected by light quality from light-emitting diodes during somatic embryogenesis. *Plant Biotechnology Reports* **4**: 303–309.
- PINES J. 1995. Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochemical Journal* **308**: 697–711.
- RODKIEWICZ B., ŚNIEŻKO R., FYK B., NIEWĘGŁOWSKA B., TCHORZEWSKA D. 1996. Embriologia Angiospermae rozwojowa i eksperymentalna. Wydawnictwo Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin.
- ROUDIER F., FEDOROVA E., LEBRIS M., LECOMTE P., GYÖRGYÉY J., VAUBERT D., HORVATH G., ABAD P., KONDOROSI A., KONDOROSI E. 2003. The *Medicago* species A2-type cyclin is auxin regulated and involved in meristem formation but dispensable for endoreduplication-associated developmental programs. *Plant Physiology* **131**: 1091–1103.
- ROZMUS M., DREWNIAK M., KORNAŚ A., KOBRZYŃSKI M., KRAWCZYK J. 1999a. Mitoza w komórkach merystemów wierzchołkowych korzeni zarodkowych heksaploidalnych form *Triticale*. *Rocznik Naukowo-Dydaktyczny Akademii Pedagogicznej w Krakowie* **206**: 29–40.
- ROZMUS M., DREWNIAK M., KORNAŚ A., KOBRZYŃSKI M., KRAWCZYK J. 1999b. Wpływ związków chemicznych zawartych w wodach rzek Krakowa na cykl życiowy komórek merystematycznych korzeni bobu *Vicia faba*. *Rocznik Naukowo-Dydaktyczny Akademii Pedagogicznej w Krakowie* **206**: 105–116.
- RYCHLEWSKI J. 1969. Kariologia endospermy roślin okrytonasiennych. I. Procesy różnicowania jąder. *Wiadom. Bot.* **13**(1): 43–53.
- SAKO K., MAKI Y., IMAI K., AOYAMA T., GOTO D., YAMAGUCHI J. 2010. Control of endoreduplication of trichome by RPT2a, a subunit of the 19S proteasome in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Research* **123**: 701–706.
- SCHNITTGER A., WEINL C., BOUYER D., SCHOBINGER U., HÜLSKAMP M. 2003. Misexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor *ICK1 KRP1* in single-celled *Arabidopsis* trichomes reduces endoreduplication and cell size and induces cell death. *Plant Cell* **15**: 303–315.
- SCHULZ P., JENSEN W. A. 1971. Capsella embryogenesis: the chalazal proliferating tissue. *Journal of Cell Science* **8**: 201–227.
- SCHWAB M., LUTUM A. S., SEUFERT W. 1997. Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis. *Cell* **90**: 683–693.
- SIGAL S. H., RAJIVANSHI P., GORLA G. R., SOKHI R. P., SAXENA R., GEBHARD D. R., REID SIGRIST S. J., LEHNER C. F. 1997. *Drosophila* fizzy-related down-regulates mitotic cyclins and is required for cell proliferation arrest and entry into endocycles. *Cell* **90**(4): 671–681.
- SMULDERS M. J. M., RUS-KORTEKAAS W., GILISSEN L. J. W. 1994. Development of polysomaty during differentiation in diploid and tetraploid tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants. *Plant Science* **97**: 53–60.
- SUGIMOTO-SHIRASU K., STACEY N. J., CORSAR J., ROBERTS K., MCCANN M. C. 2002. DNA topoisomerase VI is essential for endoreduplication in *Arabidopsis*. *Current Biology* **12**: 1782–1786.
- SUMNER A. T. 1998. Induction of diplochromosomes in mammalian cells by inhibitors of topoisomerase II. *Chromosoma* **107**: 486–490.
- TEYSSIER E., BERNACCHIA G., MAURY S., HOW KIT A., STAMMITTI-BERT L., ROLIN D., GALLUSCI P. 2008. Tissue dependent variations of DNA methylation and endoreduplication levels during tomato fruit development and ripening. *Planta* **228**: 391–399.
- TRAAS J., HÜLSKAMP M., GENDREAU E., HOÜFTE H. 1998. Endoreduplication and development: rule without dividing? *Current Opinion in Plant Biology* **1**: 498–503.
- TURAŁA K. 1969. Chromosomy olbrzymie u roślin. *Wiadom. Bot.* **13**(1): 33–42.
- TURAŁA-SZYBOWSKA K. 1979. Endopoliploidalność i jej znaczenie w różnicowaniu. *Wiadom. Bot.* **23**(3): 205–213.
- UIJTEWAAL B. A. 1987. Ploidy variability in greenhouse cultured and in vitro propagated potato (*Solanum tuberosum*) monohaploids ($2n=x=12$) as determined by flow cytometry. *Plant Cell Reports* **6**: 252–255.

- UTSUMI H., SHIBUYA M. L., KOSAKA T., BUDDENBAUM W. E., ELKIND M. M. 1990. Abrogation by novobiocin of cytotoxicity due to topoisomerase II inhibitor amsacrine in Chinese hamster cells. *Cancer Research* **50**: 2577–2581.
- VERKEST A., MANES C. L., VERCRIJSSE S., MAES S., VAN DER SCHUEREN E., BEECKMAN T., GENSCHIK P., KUIPER M., INZÉ D., DE VEYLDER L. 2005. The cyclin-dependent kinase inhibitor KRP2 controls the onset of the endoreduplication cycle during *Arabidopsis* leaf development through inhibition of mitotic CDKA;1 kinase complexes. *Plant Cell* **17**: 1723–1736.
- VLIEGHE K., BOUDOLF V., BEEMSTER G. T., MAES S., MAGYAR Z., ATANASSOVA A., DE ALMEIDA-ENGLER J., DE GROODT R., INZÉ D., DE VEYLDER L. 2005. The DP-E2F-like gene DEL1 controls the endocycle in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* **15**: 59–63.
- WANG S., WANG J. W., YU N., LI C. H., LUO B., GOU J. Y., WANG L. J., CHEN X. Y. 2004. Control of plant trichome development by a cotton fiber MYB gene. *Plant Cell* **16**: 2323–2334.
- WEINSTEIN J., JACOBSEN F. W., HSUCHEN J., WU T., BAUM L. G. 1994. A novel mammalian protein, p53CDC, present in dividing cells is associated with protein-kinase activity and has homology to the *Saccharomyces cerevisiae* cell division cycle proteins Cdc20 and Cdc4. *Molecular and Cellular Biology* **14**: 3350–3363.
- WEISS A., HERZIG A., JACOBS H., LEHNER C. 1998. Continuous Cyc/in E expression inhibits progression through endoreduplication cycles in *Drosophila*. *Current Biology* **8**: 239–242.
- WEISS H., MALUSZYNSKA J. 2001. Molecular cytogenetic analysis of polyploidization in the anther tapetum of diploid and autotetraploid *Arabidopsis thaliana* plants. *Annals of Botany* **87**: 729–735.
- WĘDZONY M. 1982. Endopolyploidy and structure of nuclei in the antipodals and synergids of *Ranunculus baudotii* Godr. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica* **24**: 43–62.
- WILLIAMSON V. M., HUSSEY R. S. 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *The Plant Cell* **8**: 1735–1745.
- YAMAGUCHI S., MURAKAMI H., OKAYAMA H. 1997. A WD repeat protein controls the cell cycle and differentiation by negatively regulating Cdc2/B-type cyclin complexes. *Molecular Biology of the Cell* **8**: 2475–2486.
- YIN Y., CHEONG H., FRIEDRICHSEN D., ZHAO Y., HU J., MORA-GARCIA S., CHORY J. 2002. A crucial role for the putative *Arabidopsis* topoisomerase VI in plant growth and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **99**: 10191–10196.
- ZACHARIAE W., SCHWAB M., NASMYTH K., SEUFERT W. 1998. Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science* **282**: 1721–1724.
- ZHUKOVA G. Ya., SOKOLOVSKAYA T. B. 1977. Ul'trastruktura antipod zarodyshevogo meshka *Aconitum napellus* L. (Ranunculaceae) pered oplodotvoreniiem = Ultrastructure of antipodals of *Aconitum napellus* L. (Ranunculaceae) embryo sac before fertilization. *Botanicheskij Zhurnal* **62**(11): 1600–1611.