

JAN BURCZYK

SPOROPOLLENINA W ŚCIANIE KOMÓRKOWEJ ROŚLIN WYŻSZYCH

Występowanie i rola sporopolleniny (SP) w materiale biologicznym

Sporopollenina jest substancją występującą w ścianach komórkowych (SK): licznych zarodników, ziaren pyłku oraz komórek glonów. Jej odkrycia dokonał John (cyt. za [51]) wyodrębniając ze spor *Lycopodium clavatum* i pyłku *Pinus silvestris* wyekstrahowanego rozpuszczalnikami organicznymi, substancję odporną na działanie ługu i innych czynników chemicznych, która zachowywała pierwotną strukturę i urzeźbienie ziaren pyłku.

W podobny sposób uzyskiwał oporną substancję z ziaren pyłku Braconnot (1829, cyt. za [51]), nazywając ją — polleniną (od łac. *granum pollinarium*). Około 100 lat później podjęto w szkole Zetschego intensywne badania nad wyjaśnieniem natury fizyko-chemicznej analogicznej substancji — sporoniny otrzymanej z zarodników (spora) widłaka *Lycopodium clavatum*. Daleko idące podobieństwo sporoniny i polleniny było powodem, że w dalszych pracach Zetschego i wsp. użyto dla ich określenia wspólnego terminu — sporopollenina (SP) [82, 83]. Tym trwającym ponad 10 lat badaniom zawdzięczamy podstawowe wiadomości dotyczące natury SP.

Obecnie termin SP stosuje się dla określenia substancji będącej pozostałością egzyny SK ziaren pyłku, zarodników, oraz ścian komórek glonów, odporną na zespół czynników chemicznych [51] — a w szczególności na acetolizę.

Przyczyną szczególnej oporności chemicznej egzyny pyłku jest fakt, że jej głównym budulcem jest SP względnie substancje do niej podobne. Trwałość egzyny, złożoność jej budowy oraz bogactwo elementów strukturalnych tworzące urzeźbienie jej powierzchni oddało cenne usługi dla taksonomii, palynologii i genetyki [3—6, 8—11, 33]. Powyższe własności egzyny umożliwiają identyfikację rodzaju i gatunku a niekiedy nawet stopnia poliploidalności roślin współczesnych i kopalnych

SK — ściana komórkowa

SP — sporopollenina

(palynologia). Szczególna odporność chemiczna SP pozwoliła na wykazanie jej obecności w kopalnych histrichosferach *Tasmanites punctatus* oraz glonach zaliczanych do *Dinoflagellata*. Badania palynologiczne umożliwiły ponadto śledzenie filogenezy *Angiospermae* [77].

Fakt zachowania wyrazistości morfologicznej obiektów, które przeleżały w ziemi 230—250 mln lat, wystawione na działanie najróżnorodniejszych czynników chemicznych i mikrobiologicznych (bakterii i grzybów), zdaje się potwierdzać słuszność poglądu, że w świecie organicznym na przestrzeni tego czasu nie było czynników zdolnych do degradacji SP, względnie, że skuteczność ich była znikoma. [30].

Zaskakująca jest obecność materiału typu SP w meteorytach jak Murray i Orgueil [77]. Przytacza się ją jako jeden z dowodów pozaziemskiego istnienia życia. We wszystkich przypadkach SP kopalna i współczesna odznaczały się bardzo zbliżonymi własnościami.

Tabela 1

Skład procentowy ścian komórkowych niektórych zarodników i ziaren pyłku z uwzględnieniem składu elementarnego SP różnego pochodzenia (wg 17)

Materiał	SK %	Celuloza %	SP %	wzór empiryczny	C-ME/C ₉₀ grup	OH/C ₉₀ grup
<i>Aspergillus niger</i>	—	—	—	C ₉₀ H ₁₁₆ O ₁₀		
<i>Mucor mucedo</i> (±) zy- gospory	9.5	5.25	4.25	C ₉₀ H ₁₃₀ O ₃₃	2.04	15
<i>Lycopodium clavatum</i>	26.1	2.7	23.4	C ₉₀ H ₁₄₄ O ₂₇		
<i>Chara coralina</i>	7.6	4.4	3.2	C ₉₀ H ₁₁₇ O ₂₈		
<i>Pediastrum duplex</i>	8.7	5.4	3.3	C ₉₀ G ₁₂₁ O ₂₈		
Polimer palmitynianu witaminy A	—	—	—	C ₉₀ H ₁₅₀ O ₁₃		
Polimer β -karotenu	—	—	—	C ₉₀ H ₁₃₀ O ₃₀		
Polimer estrów karote- noidów z <i>Lilium hen- ryii</i>	—	—	—	C ₉₀ H ₁₄₈ O ₃₈		
Polimer karotenoidów z <i>Lilium henryii</i>	—	—	—	C ₉₀ H ₁₁₀ O ₃₃		
<i>Lilium henryii</i>	8.4	3.1	5.3	C ₉₀ H ₁₄₂ O ₃₆		
<i>Lilium Longiflorum</i>	8.4	3.3	5.1	C ₉₀ H ₁₄₄ O ₃₇		
<i>Gladiolus X pandion</i>	13.2	8.9	4.3	C ₉₀ H ₁₂₇ O ₃₆		
<i>Phleum pratense</i>	6.2	2.7	3.5	C ₉₀ H ₁₄₆ O ₃₈		
<i>Festuca rubra</i>	18.0	3.8	14.2	C ₉₀ H ₁₃₈ O ₂₉		
<i>Rumex acetosa</i>	11.2	7.0	4.2	C ₉₀ H ₁₄₄ O ₃₇	2.74	
<i>Taxus baccata</i>	—	—	—	C ₉₀ H ₁₃₈ O ₂₆		
<i>Quercus robur</i>	7.1	1.3	5.8	C ₉₀ H ₁₄₄ O ₃₃		
<i>Alnus glutinosa</i>	16.8	5.1	10.7	C ₉₀ H ₁₄₄ O ₃₃		
<i>Picea excelsa</i>	21.6	5.8	15.8	C ₉₀ H ₁₄₈ O ₃₈		
<i>Pinus radiata</i>	30.0	6.6	24.4	C ₉₀ H ₁₄₉ O ₄₄		
<i>Pinus silvestris</i>	29.8	6.0	23.8	C ₉₀ G ₁₅₈ O ₄₄	1.7	13

1. Zawartość składników wyrażono w procentach wagowych względem wyjściowej masy zarodników wzgl. pyłku. 2. Wzory elementarne SP odnoszą się do umownej jednostki C₉₀.

Zdaniem Toblera (cyt. wg [70]) niemal wszystkie poznane gatunki pyłku zawierają SP lub SP-podobne substancje. Zawartość SP w materiale biologicznym podlega jednak znacznym wahaniom w zależności od przynależności do grupy systematycznej (tab. I, wg. [7]). Nie oznacza to, że SP występuje w SK spor wszystkich dotąd poznanych gatunków. Znane bowiem są zarodniki *Mucor* powstałe na drodze bezpłciowej, które nie zawierają SP. Przykładem ziaren pyłku pozbawionych SP mogą być również niektóre rośliny wodne. Ich SK jest pozbawiona egzyny. Jest ona zbudowana wyłącznie z intyny (cyt. za [70]).

Biologiczna rola SP zdaje się mieć ścisły związek z jej występowaniem. Obecność jej w ścianach komórek pełniących w życiu rośliny szczególnie doniosłą rolę, bo uczestniczących w procesach płciowych, zdaje się wskazywać na to, że SP ma chronić wspomniane komórki przekazujące informację genetyczną przed niekorzystnymi czynnikami fizyko-chemicznymi środowiska jak: wysychanie, promieniowanie UV [1, 15, 26]. Obecność SP w SK niewątpliwie zwiększa odporność komórek na mechaniczne urazy, odkształcenia i nadaje im dodatkowe cechy rozpoznawcze (złożoność budowy i swoiste urzeźbienie egzyny).

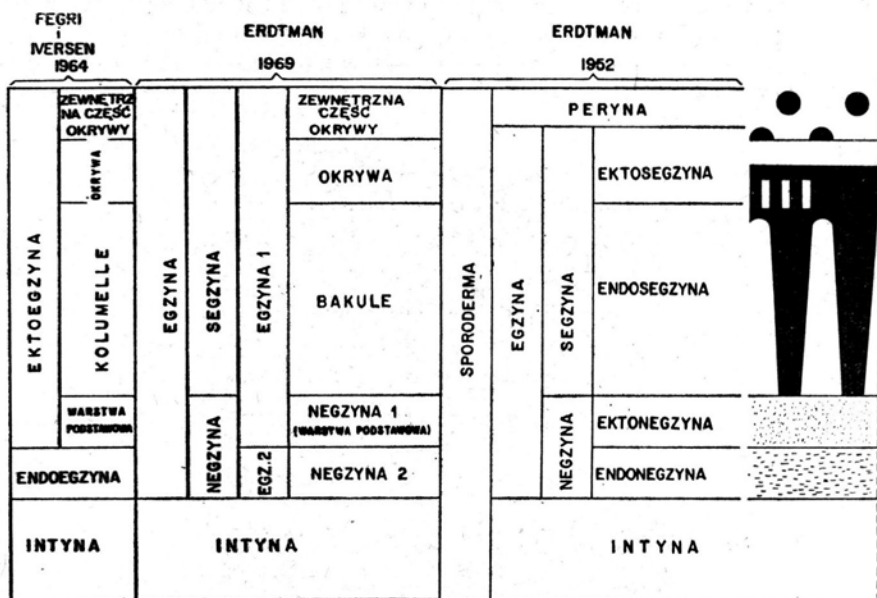
Znamienne jest występowanie SP obok karotenoidów (wyłącznie w sporach *Mucor* powstałych na drodze płciowej [70]). Wspólne występowanie SP i karotenoidów może sugerować związek genetyczny między tymi substancjami.

Umiejscowienie SP i substancji jej towarzyszących w SK ziaren pyłku roślin

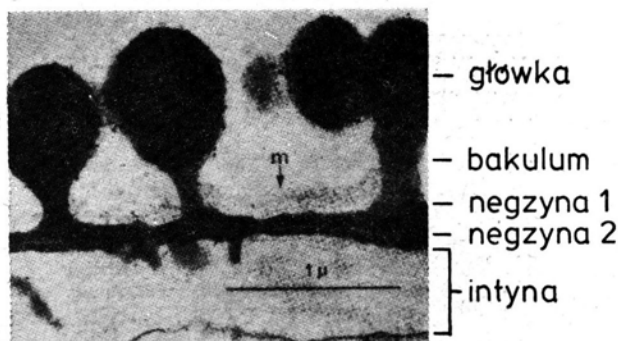
Najczęściej przytaczanym przykładem modelu budowy SK i egzyny jest ziarno pyłku *Lilium*, gdyż zawiera ono wszystkie typowe warstwy (ryc. 2). Ich oznaczenie podano zgodnie z terminologią zaproponowaną przez Erdmanna (cyt. wg [34] ryc. 1). Wewnętrzna warstwa SK zwana intyną zbudowana jest z fibrylli celulozowych [44, 73] osadzonych w substancji zwanej matrix zawierającej hemicelulozy i białka [44]. Warstwa zewnętrzna o budowie złożonej, elektronowo gęsta, esmofilna zwana jest egzyną. W jej obrębie wyróżnia się na podstawie odmienności strukturalnej i barwliwości część powierzchniową, urzeźbioną — segzynę i część głębiej leżącą, nieurzeźbioną — negzynę (ryc. 1, 2, 4). U niektórych roślin jak np. *Populus tremula* stwierdza się również cienką powierzchniową warstwę egzyny zwaną — exine surface coating [61]. Powłoka ta wybarwia się przy użyciu czerwieni rutenowej. Równoczesna ujemna reakcja PAS, oraz ujemna reakcja ninhydrynowa tej warstwy sugeruje, że nie zawiera ona polisacharydów ani białek [61]. W ścianie komórkowej (sporodermie) wielu gatunków roślin występują pory (apertury). Te ostatnie przykrywa warstwa negzyny i intyny. Głównymi elementami strukturalnymi segzyny są pałeczki. Są to twory promieniście rozstawione na powierzchni ziarna pyłku, wyrastające z negzyny. Każda pałeczka (pilum) składa się z laseczki (baculum) i rozszerzonej główki (caput). Główki wolno stojące tworzą pałeczkowaty typ egzyny, zrosnięte ze sobą tworzą daszek (tegillum), względnie grubą warstwę dachowatą zwaną tectum, tzw. ziarna pyłku okryte [44]. Powierzchnia daszka

bywa gładka, lub pokryta różnymi wyrostkami (kolcami, brodawkami, pręcikami lub siateczką).

Występowanie morfologiczne podobnych struktur powierzchniowych (epistuktur) stwierdzono u taksonomicznie bardzo odległego glonu *Scenedesmus*, ma ono znaczenie w klasyfikacji szczepów [49, 50].

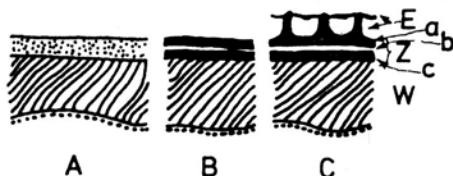


Ryc. 1. Schematyczna budowa warstw SK pyłku (zestawienie wg [34]).

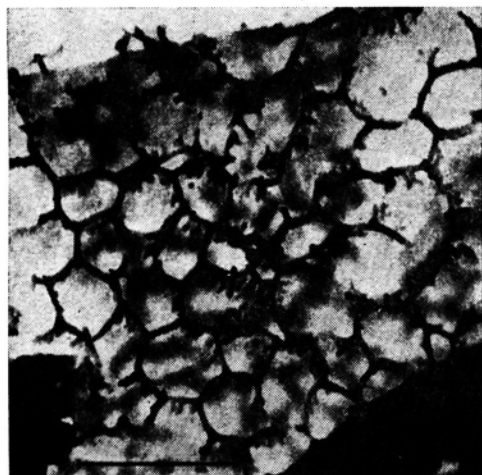


Ryc. 2. Przekrój przez SK ziarna pyłku *Lilium*. SP występuje w ciemnych (elektronowo gęstych) elementach egzyny. Fibrylna warstewka "m" jest usuwana przez acetolizę [40].

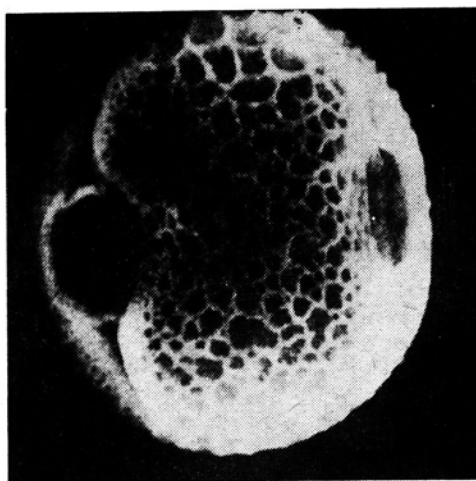
W całej SK niektórych gatunków roślin jak np. *Lycopodium*, oraz w egzynie traw występują kanaliki umożliwiające utrzymanie chemicznego kontaktu cytoplazmy z egzyną. Stwierdza się w nich obecność enzymów i glikoproteidów. Tą drogą mogą przenikać różne substancje w tym także białka [52, 64]. Na krótko przed



Ryc. 3. Schemat budowy SK glonów zielonych na przykładzie rodzaju *Chlorella* i *Scenedesmus*. (A) SK szczepów *Chlorella* nie wytwarzających wtórnych karotenoidów i SP. (B) SK szczepów *Chlorella* lub *Scenedesmus* wytwarzających wtórne karotenoidy i SP, lecz nie wytwarzających epistruktur, (C) jak w pkt. B, lecz wytwarzające epistruktury. (W) — warstwa wewnętrzna (celulozowa), (Z) — warstwa zewnętrzna zbudowana z 3 podwarstw a, b, c. Podwarstwy "a" i "c" oraz epistruktury zawierają SP; (E) — epistruktury.



Ryc. 4. Pyłek *Hedera helix*, elektronowy mikroskop wybiórczy (Scanning) pow. ok. 3100x (wg [12])
Preparat po acetolizie napyłony węglem i złotem



Ryc. 5. Powierzchnia *Scenedesmus intermedius* Chod. z widocznymi epistrukturami i "kolcami". Zaznaczony odcinek odpowiada długości 1µm. Preparat napyłony platyną i węglem (wg [50]).

osiągnięciem ostatecznej dojrzałości pojawia się na powierzchni, a także w kanałkach ziaren pyłku wielu gatunków roślin lipidowa substancja zawierająca karotenoidy, zwana — Pollenkit [14, 41, 45, 46]. Powleka ona powierzchnię egzyny i wypełnia przestrzeń między kolumellami. Miejscem jej syntezy są w przypadku *Lilium* i *Raphanus* [18] plastydy komórek tapetum. Pojawienie się „Pollenkitu” dopiero po zakończeniu rozwoju egzyny tj. tuż przed mitozą i uwolnieniem ziaren pyłku wyklucza zdaniem Heslop-Harrisona i wsp. [42] uczestnictwo karotenoidów (nagromadzających się w końcowych stadiach rozwoju komórek tapetum) w tworzeniu egzyny. Nagromadzenie znacznej ilości karotenoidów w komórkach tapetum, oraz w płynie woreczka pyłkowego może być skutkiem zahamowania syntezy SP.

Dalszymi warstwami egzyny są negzyna 1 i leżąca bardziej wewnątrz negzyna 2. Oddziela je pośrednia warstewka o małej gęstości elektronowej.

W zależności od przynależności obiektu wytwarzającego SP do różnych grup systematycznych obserwuje się różny stopień rozwoju poszczególnych obszarów egzyny. Mogą one z różnych gatunków przybierać postać homogenną, lamellarną, fibryllarną lub ziarnistą. Szczegółowego przeglądu różnych typów struktur egzyny na różnych etapach ewolucji dokonuje Gabara [36].

U stosunkowo prymitywnych jednokomórkowych odmian glonów (*Chlorophyceae*) wytwarzających ketokarotenoidy, SP występuje również w zewnętrznej części oraz epistrukturach SK.

Głównym składnikiem budulcowym egzyny ziaren pyłku jest SP lub substancje własnościami do niej podobne [40, 51, 84]. Uwagę zwraca brak danych odnośnie jakościowego i ilościowego składu chemicznego samej natywnej (biologicznie niezmienionej) egzyny ziaren pyłku tj. egzyny uwolnionej od intyny. Istniejące wyniki analiz chemicznych odnoszą się do całych SK tj. egzyny łącznie z intyną względnie całych ziaren pyłku. Nie zbadany jest ponadto wpływ acetolizy na usuwanie składników egzyny towarzyszących SP (lipopolisacharydów).

Natura chemiczna SP (izolacja, metody badań, struktura)

Izolacja SP polega na usuwaniu towarzyszących jej substancji przez: rozkład białek, zmydlanie tłuszczu i wosku (pod wpływem wodnego KOH), wypłukiwanie lipidów eterem i etanolem, usunięcie polisacharydów np. hemiceluloz (prócz celulozy) działaniem stosunkowo stężonego ługu i wody. Po tych zabiegach pozostaje odporna na nie celuloza i SP, tym samym zostaje zachowany charakterystyczny kształt ziaren pyłku i komórek glonów.

Kwaśna hydroliza celulozy zwana acetolizą prowadzi do uwolnienia SP od celulozy, pozwalając jednocześnie na ilościowe oznaczenie tej ostatniej z ubytku masy. Acetolizę przeprowadza się według różnych sposobów. Najczęściej stosuje się mieszaną bezwodnika kwasu octowego z 72% kwasem siarkowym (w stosunku 9 : 1) stosując czas reakcji 20 min, i temperaturę wrzącej łaźni wodnej [31, 32, 80]. Barwa tak uzyskanej SP jest ciemno-brunatna, a dłuższe traktowanie jej tą mieszaniną prowadzi do prawie czarnych produktów utlenienia, zanieczyszczają-

cych SP. Inne sposoby acetolizy polegają na stosowaniu 42% HCl [48], lub 85% kwasu o-fosforowego [51]. Ten ostatni wymaga dłuższego czasu acetolizy — 4 dni na gorąco lub 10 dni w temperaturze pokojowej [1, 51], w efekcie pozwala on na uzyskaniu SP o zabarwieniu beżowo-brunatnym uchodzącej za najczystsza.

Warunkiem uzyskania powtarzalnych wyników oznaczania SP jest ściśle zachowanie parametrów analizy tj. kolejności, czasu działania czynników chemicznych, temperatury itd. Stąd oznaczanie SP ma charakter analizy konwencjonalnej często stosowanej w odniesieniu do ciał niezupełnie zdefiniowanych chemicznie [51].

Od czasów pionierskich badań zebrano sporo danych odnośnie budowy i własności chemicznych SP [2—11, 32, 56—66, 78—82].

a) Odporność na acetolizę jest uważana za pozytywny wynik testu na obecność SP. Świadczy ona o tym, że pomimo ewentualnych modyfikacji SP wskutek izolacji, zasadniczy zrąb jej cząsteczki pozostaje niezmienny [70]. SP otrzymana wskutek acetolizy jest substancją nierozpuszczalną w rozpuszczalnikach organicznych, zbudowaną z atomów C, H, O, których ilościowy stosunek ulega pewnym wahaniom w zależności od pochodzenia. Z reguły SP nie zawiera azotu, niekiedy może zawierać tylko niewielkie ilości (do 1% N₂) uważane jako zanieczyszczenie, obok trudnych do usunięcia zanieczyszczeń mineralnych. Wyniki analizy elementarnej pozwoliły na przedstawienie wzorów sumarycznych SP w postaci umownych jednostek zawierających 90 atomów węgla. Tabela I przedstawia szereg wzorów dla SP różnego pochodzenia [84].

b) Stosowanie różnych czynników usuwających związki towarzyszące SP jak 40% HCl, względnie 72% H₂SO₄, może być powodem wprowadzenia chloru lub siarki do cząsteczki [70]. Z tego względu najbardziej wskazane wydaje się stosowanie dla izolacji SP 85% kwasu o-fosforowego (4 dni, na gorąco) względnie w temperaturze pokojowej w ciągu 10 dni, gdyż nie wprowadza on fosforu do cząsteczki SP. Potraktowanie SK zawierających SP azotanem dwuacetylu (diacetyl nitrate) usuwa skutecznie SP pozostawiając celulozę [70].

c) SP jest polimerem zawierającym znaczną ilość podwójnych wiązań. Zbromowany produkt zawiera ok. 50% Br — ulega on znacznie łatwiej rozkładowi niż wyjściowa SP [81].

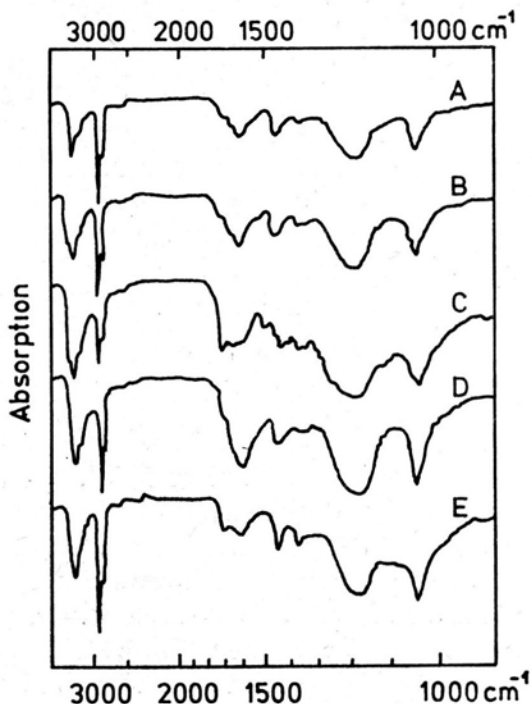
d) SP zawiera grupy hydroksylowe i grupy C-metylowe (tab. I), [70, 85].

e) SP utlenia się pod wpływem podchlorynu sodu, stężonego HNO₃, perhydrofluorowodoru i ozonu. Ten ostatni jest najskuteczniejszym utleniaczem. Produktami kolejnego traktowania SP ozonem i perhydrofluorowodorem są proste kwasy organiczne mono- i dwukarboksylowe [6, 7, 11]; stanowią one ok. 40% wyjściowej SP i świadczą o polienowej naturze SP. Powstaje również nieznaczna ilość kwasów organicznych o dłuższych łańcuchach węglowych [70]. Utlenianiu SP towarzyszy jej odbarwienie. Ilościowy stosunek względnie mało złożonej mieszaniny tych kwasów przemawia za jednolitym rodzajem monomeru, z którego powstaje SP.

f) Stapianie SP z KOH w temp. 250°C daje mieszaninę kwasów dwukarboksylowych (C₂—C₄) oraz kwasów fenolowych: m. in. kwasów p- i m-hydroksybenzoesowego i protokatechowego. Dawniej przypuszczano, że mogą one pochodzić z kompleksów SP z ligniną. Obecnie sądzi się, że powstają w określonych warunkach z samej

SP, gdyż brak wśród produktów rozpadu SP uprzednio zmetylowanej (dwuazometanem) produktów aromatycznych. Wiadomo jednak, że także β -karoten może podczas ogrzewania w temp. 160°C ulegać aromatyzacji [70].

g) Charakterystyczne widmo SP w zakresie światła podczerwonego umożliwia prosty sposób identyfikacji. Przedstawione na ryc. 6 i 7 widma w zakresie podczerwieni SP różnego pochodzenia wskazują pewne minimalne różnice w zakresie długości fal $1750\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$. Można sądzić, że są one spowodowane różnicami ilościowymi zawartości wywołujących je grup [1].

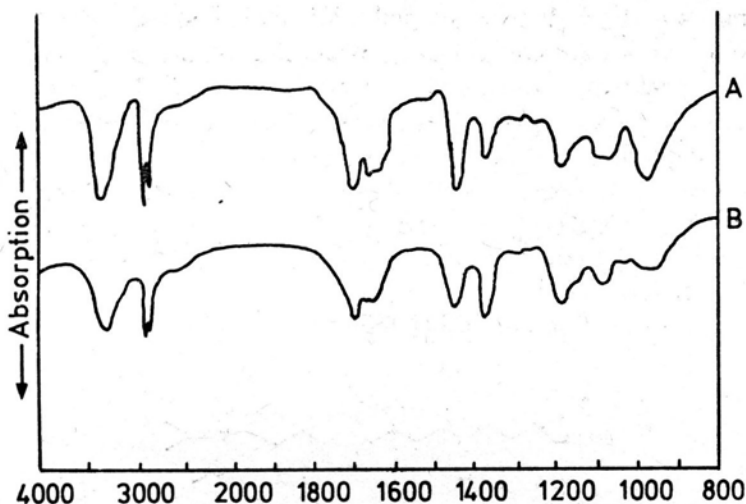


Ryc. 6. Widma absorpcyjne w zakresie podczerwieni uzyskane z substancji odpornej na acetolizę, którą otrzymano z: (A) *Chlorella* 211—8p, (B) *Chlorella* 211—8b, (C) *Lycopodium clavatum* — zarodniki, (D) *Scenedesmus quadricauda* 276—4a, (E) *Prototheca portoricensis* 263—3b. Pozioma oś: częstotliwość fali.

h) W zakresie światła UV SP posiada maksimum absorpcji 310 nm (względnie 290 nm) i minimum 254 nm w zależności od pochodzenia. Pod wpływem acetolizy następuje przesunięcie maksimum z 310 nm do 290 nm . Te własności SP wykorzystano w metodzie mikrofotometrii skrawków pyłków w świetle UV do badania jej lokalizacji w obrębie SK [75].

i) SP cechuje współczynnik załamania światła w granicach $1.5\text{--}1.6$ (dane cyt. wg 40). Nieznaczna lub zerowa interferencja promieni X może sugerować zależność struktury mikrokryształicznej od czynników fizycznych i chemicznych [40].

j) SP będącej dominującym składnikiem egzyny przypisuje się zdolność przyłączania atomów metali ciężkich (lantanu, srebra, toru, żelaza) oraz barwników kationoidowych (błękitu alcjanoowego, czerwieni rutenowej) zazwyczaj dodawanych



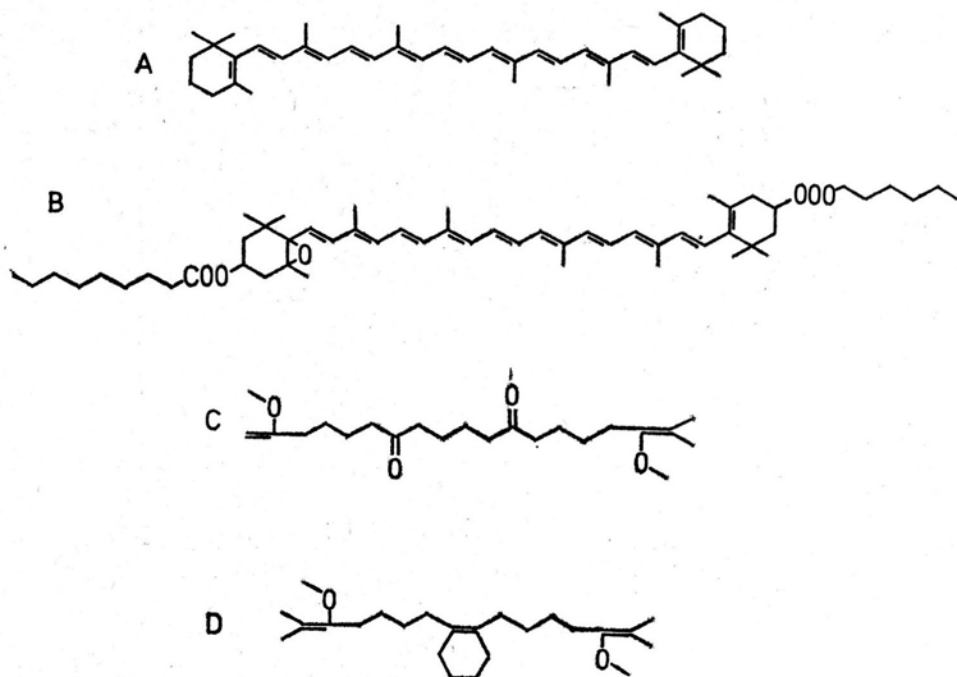
Ryc. 7. Widma absorpcyjne sporopolleniny uzyskane w zakresie podczerwieni (A) — z egzyny pyłku *Lilium henryii*; (B) — Sporopolleniny otrzymanej syntetycznie przez oksydacyjną kopolimeryzację karotenoidów i ich estrów wyizolowanych z *Lilium henryii* (wg [2]).

do aldehydowych utwalaczy. Dla uwidocznienia struktury egzyny szczególne znaczenie ma kolejność stosowanych zabiegów [35, 61, 69].

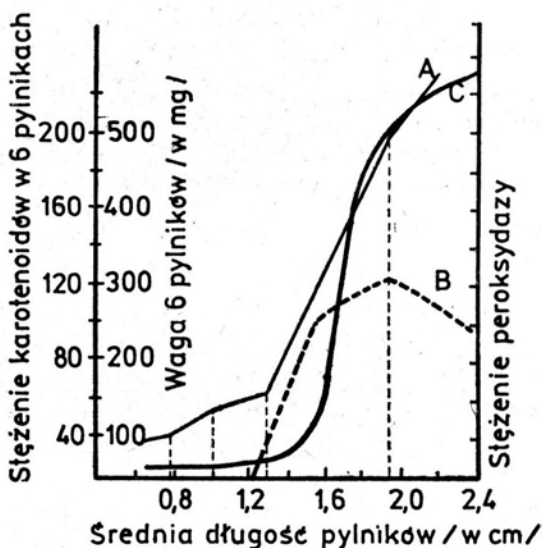
Dla wyjaśnienia natury chemicznej SP przyjmowano różne koncepcje, między innymi, że jest ona substancją lipidową zbliżoną do kutyny (Tschirch i Czapek, cyt. wg [81], względnie, że jest polisacharydem o wielkiej masie cząsteczkowej [78]. Sądzone także, że może ona być substancją utworzoną z celulozy, ksylanu, lignino-podobnego materiału i dużych ilości lipidów [70].

Zdaniem niektórych autorów [40, 70] w skład SP wchodzi dwie frakcje: lipidopodobna i lignino-podobna. Z pierwszej podczas rozkładu powstawać mają jedno- i dwu-karboksyłowe kwasy z widoczną przewagą 16-węglowych kwasów. Za przyczynę ujemnej reakcji egzyny w teście histologicznym uważa się osłonięcie lignin przez lipidy. Podaje się także, że egzyna we wczesnych etapach rozwoju reaguje bardziej dodatnio w tym teście [40].

Zetzsche i wsp. przypisywali SP naturę politerpenową [81, 83]. Jest ona znacznie bardziej odporna na redukcję niż miękka guma. Pod wieloma względami jest ona podobna do twardej gumy. Rozkłada się w temp. 300°C, pali się kopcącym płomieniem. W egzynach utlenionych SP jest odporna na większość odczynników chemicznych. Częściowe rozpuszczanie materiału egzyny ma następować w 2-aminoetanolu w temp. 130—140° [63]. Uwolnione substancje próbuje się utożsamiać z wielkocząsteczkowymi lipopolisacharydami. Zawierają one grupy anionowe, wybarwiają się solami metali ciężkich, proteinianem srebra i OsO₄. Wodne ich roztwory dają trwałą metachromazję z niektórymi barwnikami kationoidowymi jak np. z błękitem toluidynowym. Tak więc zanik barwliwości egzyny tymi odczynnikami, w trakcie jej dojrzewania, można by tłumaczyć wzmagającymi się osłanianiem (maskowaniem) cząsteczek lipopolisacharydów przez odkładającą się SP.



Ryc. 8. Hipotetyczne fragmenty strukturalne tworzące SP. (A) β -karoten, (B) ester dwupalmitynowy anteraksantyny, (C) fragment zawierający pochodne ketonowe karotenoidów (wg [71]), (D) fragment zawierający pierścień cykloheksenowy (wg [57]).



Ryc. 9. Zmiany stężenia karotenoidów i peroksydazy w pylnikach *Lilium henryi* w zależności od stadium dojrzwania, (A) — krzywa wzrostu pylników, (B) — stężenie peroksydazy, (C) — stężenie sumy karotenoidów, Stadia dojrzwania: 1. tkanka sporogenna, 2. stadium diad, 3. stadium tetrad, 4. stadium odkładania egzyny, 5. ziarna pyłku (wg [70]).

Myśl Zetschego o politerpenowym charakterze SP podjęli i rozwinęli Brooks i Shaw [2, 70]. Przyjęcie ich hipotezy, że SP jest polimerem karotenoidów i ich estrów (uważanych za monomery) wydaje się słuszne z wielu względów, gdyż tłumaczy: wysoki stopień jej nienasyceń, lipidową strukturę, nierozpuszczalność, zawartość grup -O-Me, grup -OH, powstawanie pod wpływem ozonu z komponenty karotenoidowej prostych kwasów karboksylowych, oraz powstawanie w tych warunkach (z kwasu tłuszczowego, wchodzącego najwidoczniej w skład grupy estrowej) kwasów organicznych o dłuższym łańcuchu. Mała zawartość mono- i dwukarboksylowych kwasów (o dłuższym łańcuchu), które miałyby powstawać z nienasyconych kwasów, świadczy o znikomym udziale takich kwasów tłuszczowych w tworzeniu SP (ryc. 8 i 9).

Opisane próby rekonstrukcji cząsteczki SP na podstawie produktów jej rozpadu mają ograniczone możliwości i nie dają wyczerpujących informacji ani o strukturze SP, ani o sposobie jej powstawania.

Powstawanie egzyny u roślin wyższych

Do poznania budowy i ontogenezy egzyny SK ziaren pyłku wydatnie przyczynił się postęp w dziedzinie mikroskopii elektronowej.

Powstawanie zawiązków sporodermi i urzeźbienia egzyny rozpoczyna się w stadium tetrady [22, 73]. Chociaż pierwotnie przyjmowano, że urzeźbienie egzyny jest wynikiem ekspersji fenotypowej genomu haploidalnego jądra determinującego odpowiednie aktywności cytoplazmy samych mikrospor [24, 43, 52, 54], obecnie uważa się, że czynnikiem kontrolującym to urzeźbienie jest cytoplazma komórek macierzystych ziaren pyłku [22]. W wyniku mejozy z każdej komórki macierzystej ziaren pyłku powstają 4 haploidalne komórki siostrzane (mikrospory), które w miarę rozwoju przekształcają się w ziarna pyłku. Występują one w postaci tetrad (4 mikrospory razem). Oddziela je od siebie i od otaczającego środowiska komórek tapetum — otoczka utworzona z kalozy (wielocukru będącego β -[1-3 glukanem] [39, 55].

Na istnienie związku między usytuowaniem endoplazmatycznego retikulum (ER), płasko przylegającego do plazmolemy a miejscami odkładania przyszłych promieniście sterczących bakuli, względnie umiejscowieniem bruzdy (colpus) w segzyinie SK *Silene* zwrócił pierwszy uwagę Heslop-Harrison [38]. Według niego w miejscach nie sasiadujących z cysternami-ER pojawiają się pierwsze odznaki odkładania wczesnej egzyny tzw. primegzyny [22]. Przyszły wzór urzeźbienia egzyny byłby tym samym w ogólnym zarysie uwarunkowany wewnątrzkomórkowo [22, 73]. Niektórzy autorzy jak np. [59, 67, 68] sądzą, że tworzenie urzeźbienia egzyny zachodzi przy współudziale kompleksu plazmolema-glycocalyx, w skład którego mają wchodzić glikoproteidy i mukopolisacharydy [67, 68]. Ostatecznie mechanizm tworzenia wzorca SK nie został wyjaśniony. Obecnie uważa się, że determinująca rola cytoplazmy w kształtowaniu urzeźbienia egzyny wynika z rozmieszczenia w powierzchniowej strefie mikrospory pęcherzykowatych tworów [17, 22].

Morfologiczny obraz tych pęcherzyków zmienia się w zależności od gatunku. U *Pinus* i *Lilium* przypominają one pęcherzyki diktiosomów, u *Cosmos reticulum* endoplazmatyczne. Pochodzenie tych pęcherzyków uczestniczących w tworzeniu egzyny nie zostało dotąd wyjaśnione. Ich pojawienie zbiega się z bardzo obficie występującymi w tym czasie w cytoplazmie strukturami ER. O rozmieszczeniu pęcherzyków i wzorca egzyny ma decydować cytoplazma [22]. Współuczestniczą przy tym mikrotubule i diktiosomopodobne struktury [22]. W wyniku interakcji pęcherzyków z plazmolemą dochodzi do przekopiowania wzorca na powierzchnię protoplastu w postaci warstwy pęcherzyków, względnie wypukłości protoplazmatycznych -późniejszych miejsc pojawiania się probakuli (lipidowej natury) prawdopodobnie zbudowanych z protosporopolleniny [41]. Wtórnie odkłada nie polisacharydów przez pęcherzyki pochodzące z diktiosomów wiąże się z cofaniem plazmolemy (z wyjątkiem miejsc protruzji), odsunięciem jej od kalozowej ściany i kurczeniem się protoplastu [22, 73]. Towarzyszy temu wzmożone odkładanie w utworzonej przestrzeni młodej segzyny. Stopniowo wzrasta także gęstość elektronowa odłożonego przez mikrospore materiału [37, 38].

Przyjmuje się, że u *Cosmos bipinatus* polimeryzacja prekursorów SP zachodzi raczej w przestrzeni między cytoplazmatycznymi protruzjami niż na nich samych [22], (ryc. 10). Utworzony bowiem wzór jest negatywem rozmieszczenia protruzji. Dalsze grubienie segzyny zachodzi po uwolnieniu mikrospor ze ściany tetrady prawdopodobnie przy współdziałaniu prekursorów SP lub SP wytworzonej przez tapetum. Odmienny sposób tworzenia segzyny ma miejsce u *Pinus banksiana* [17 22]. Segzyna powstaje tu wskutek zgrubienia pęcherzyków wytworzonych na powierzchni mikrospor znajdujących się w tetradach.

Egzyna ziaren pyłku i spor wielu gatunków [19, 52, 60] wykazuje obecność elektronowo-przejrzystych linii. Zgodnie z przyjętą terminologią zaproponowaną przez Dickinsona i Heslop-Harrisona [20] określa się je jako lamelle. Zdaniem Rowley i Southworth [66] tworzenie egzyny ma zachodzić przez odkładanie SP na wspomnianych lamellach. Omawiane lamelle są wytwarzane przez zewnętrzną powierzchnię protoplastu [16, 19, 20, 29] Przechodzenie tworzących je substancji przez plazmolemę, może zachodzić wskutek ekstruzji w miejscach nieciągłości plazmolemy. Grubość opisywanych lamelli osiąga 0.3—0.4 μm . Są one szczególnie dobrze widoczne w obszarach egzyny przyległych do szczelin. W sporach *Scapania nemorosa* większa część SK posiada lamellarną strukturę. W dojrzałej egzynie ziaren pyłku *Acropyle Sequoia* i *Lycopodium* stwierdza się zachowaną strukturę zawierającą pojedyncze lamelle (Afzelius, cyt. za [66]. U *Artemia* [76] lamelle elektronowo-przejrzyste usytuowane po zewnętrznej stronie plazmolemy wykazują długość w granicach od 10 nm do ok. 1 μm . Mogą one łączyć się z plazmolemą poprzez ziarnistą substancję [23]. Lamelle wybarwiają się kwasem fosforowo-wolframowym w obecności kwasu chromowego, co przemawia za tym, że zawierają one polianiony [63].

Bezpośrednio po utworzeniu lamelli na obu jej powierzchniach zostaje zainicjowane odkładanie SP. Powstaje w ten sposób „sporopollenin lamella” — lamella sporopolleninowa — 3 składnikowa struktura o wymiarach błony elementarnej

ze SP odłożoną na jej obu powierzchniach. Istnieją dane, że odkładanie SP może zachodzić w sposób asymetryczny [61]. Elektronowo-gęsta część lamelli sporopolleninowej ma grubość ok. 60 Å jest ona odporna na acetolizę. Utożsamia się ją z SP [60]. Elektronowo-przejrzysta część lamelli sporopolleninowej o grubości ok. 40 Å [37, 47, 66] i regularnej budowie przypomina strukturę parakrystaliczną [60].

Lamellarne twory biorą również udział w tworzeniu bakuli [16, 19]. Odkładanie SP zapoczątkowane w młodych kolumellach postępuje szybko w kierunku dośrodkowym [73]. Zachodzi ono poprzez postępujące rozprzestrzenianie się proksymalnych i dystalnych końców probakuli. W piśmiennictwie napotyka się ponadto inne terminy dla struktur związanych z tworzeniem SP jak np. „parent lamella”. Nazwa ta odnosi się do środkowej elektronowo-przejrzystej części lamelli sporopolleninowej. Grubość tej części wynosi 4–5 nm, opisano ją m. in. w egzynie *Ipomea purpurea* [37]. Stosuje się również równoznaczne określenie „low dense line” [64]. Dokładny skład chemiczny „parent lamella” nie jest dotąd znany. Struktura ta powstaje u *Lilium longiflorum* [20] przez apozycję na powierzchni plazmolemy, tuż po uwolnieniu mikrospor z tetrad. Postępujące odkładanie (polimeryzacja SP) na lamellach daje początek warstwie negzyny. Szczegóły mechanizmu powstawania negzyny nie są obecnie znane.

Ostateczna egzyna ma powstawać przez równoległe do powierzchni plazmolemy ułożenie lamelli pokrytych SP, jednej pod drugą [22, 37]. W miarę dojrzewania egzyny lamellarna struktura zaciera się [22, 61, 69]. Obecność SP w tzw. trójlaminarnej strukturze stanowiącej zewnętrzną warstwę SK glonów (*Chlorophyceae*), ryc. 3 [1], oraz w pojedynczej lamelli u spor mchów [53] morfologicznie odpowiadającej lamellom tworzącym negzynę ziaren pyłku, sugeruje daleko idące podobieństwo struktur związanych z występowaniem i tworzeniem SP u tak odległych taksonów.

Podobny mechanizm odkładania SP na lamelli zdaje się funkcjonować na powierzchni lipidowych kulistych tworów zwanych prociałami Ubischa [27, 36, 66] będących wytworem komórek tapetum.

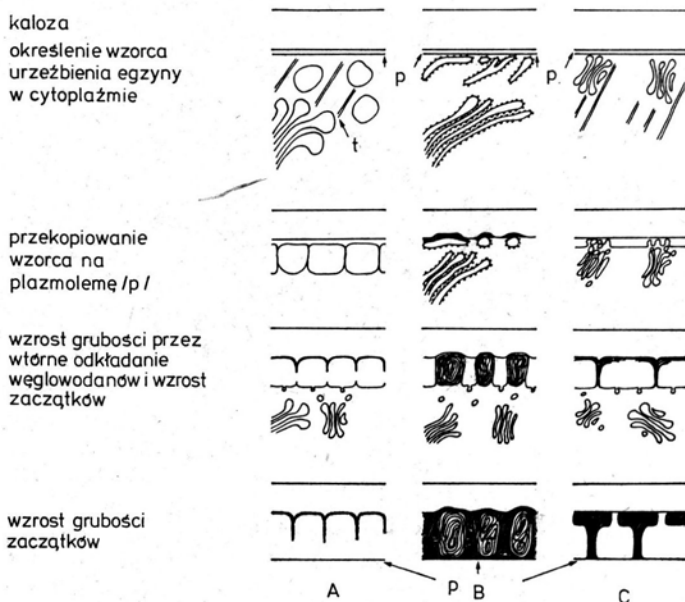
Wyraźnie widoczne są elektronowo-gęste almelle w SK megaspor *Selaginella helvetica* [72]. Wydaje się, że w tym wypadku lamella SP może tworzyć się wskutek uporządkowania „rozwarstwienia” i polimeryzacji składników ostatecznie widocznych jako elektronowo gęste i elektronowo-przejryste (tworzące wewnętrzną część późniejszej lamelli). Powstające lamelle SP posiadają zaczątki rozgałęzień (późniejszych połączeń międzylamellarnych). Przestrzenie między lamellami SP zawierają elektronowo-gęste ziarnistości. Ich występowanie maleje w kierunku odśrodkowym.

Czynniki towarzyszące odkładaniu negzyny II

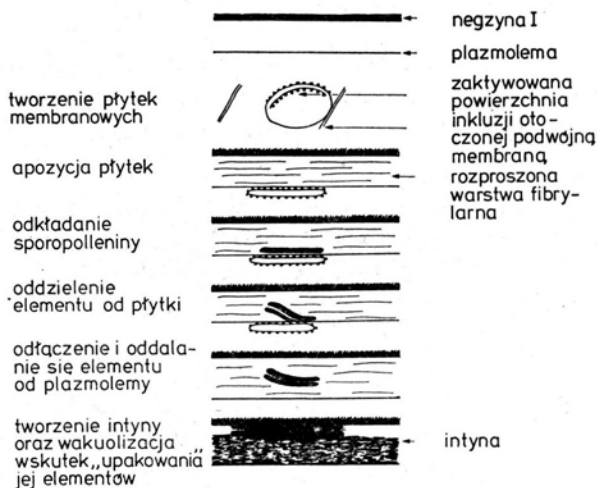
Szczegółowy opis procesu powstawania segzyny i negzyny różnych gatunków przedstawiono według Dickinsona (ryc. 10 i 11) [22].

Odkładanie cienkiej warstewki negzyny I ma miejsce w okresie gdy mikrospory nie są jeszcze uwolnione z tetrad. Procesu powstawania negzyny I dotąd nie wyjaśnio-

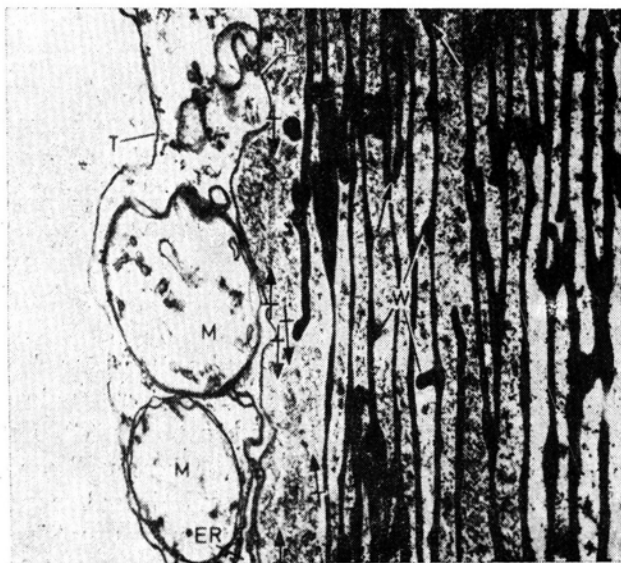
no. Wiadomo jednak, że proces ten jest ściśle związany z plazmolemą. Po uwolnieniu mikrospor dochodzi do odkładania negzyny II. W powierzchniowej warstwie cytoplazmy młodych mikrospor znajdujących się w tetradach dochodzi do gromadzenia pęcherzykowatych tworów o średnicy ok. $0,5 \mu\text{m}$. W obszarze ich sąsiedztwa z plazmolemą rozwija się po zewnętrznej stronie plazmolemy w SK elektronowo-przejrzysta lamella jest ona oddalona od plazmolemy ok. 8 nm (ryc. 11). Jednym



Ryc. 10. Powstawanie segyzny u: (A) — *Pinus*, (B) — *Cosmos*, (C) — *Lilium*, (wg[22]).



Ryc. 11. Odkładanie negzyny u *Lilium* (wg [22]).



Ryc. 12. Przekrój przez dystalny obszar sporodermi makrospory *Selaginella helvetica* wraz z przyległą do niej warstwą cytoplazmy i częścią negzyny. Po zewnętrznej stronie nieregularnie przebiegającej plazmolemy (PL) i pomiędzy lamellami negzyny warstwa matrix o włóknisto-siatkawkowej strukturze; zawiera ona ziarnistości o różnej wielkości. W warstwie matrix w sąsiedztwie plazmolemy zaznaczona jest jej niejednolita struktura (przekreślone strzałki). ER — endoplazmatyczne retikulum wraz z rybosomami, M — mitochondria, T — tonoplast, W — brodawkowate zgrubienia występujące na lamellach negzyny. Strzałki oznaczają rozgałęzienia w kształcie litery Y między dwoma lamellami. Utrwalanie: OsO₄, powiększenie 45000 ×.

końcem jest ona przyczepiona do powierzchni plazmolemy. Równocześnie dochodzi do wzmoczonego odkładania elektronowo-gęstego materiału na powierzchni przejrzystej lamelli (od strony plazmolemy). Trudno dokładnie rozgraniczyć strukturę tej lamelli od plazmolemy. Obserwacje przemawiają za usytuowaniem tej lamelli po zewnętrznej stronie plazmolemy. Oprócz aktywności plazmolemy, w tworzeniu negzyny zdają się uczestniczyć gładkie pęcherzyki diktiosomów oraz „coated vesicles” licznie w tym czasie zgromadzone na powierzchni protoplastu.

Niektóre z powstałych elementów negzyny odłączają się od plazmolemy. Odłączeniu przejrzystej lamelli od zewnętrznej strony plazmolemy towarzyszy zdaniem Dickinsona [22] uwalnianie się rybosomów z membrany pęcherzyka, usytuowanego po wewnętrznej stronie plazmolemy. Rybosomy mają powracać do wnętrza cytoplazmy. Jest możliwe, że pod wpływem czynników zawartych we wnętrzu membranowej płytki, dochodzi do regulowania aktywności plazmolemy, a tym samym transportu prekursorów SP na zewnątrz plazmolemy.

Wytworzoną negzynę cechuje odporność na acetolizę i dodatnia reakcja PAS. Ta ostatnia przechodzi w negatywną reakcję po uwolnieniu mikrospory z tetrady. W momencie odłożenia negzyny rozpoczyna się odkładanie celulozowej intyny.

Pogrubianie młodej segzyny

Pogrubianie segzyny zachodzi u różnych gatunków w odmienny sposób. U *Cosmos* [22] ma miejsce bezpośrednia polimeryzacja materiału zawartego między protruzjami. Materiał ten, prawdopodobnie natury lipidowej, zostaje przetransportowany z cytoplazmy do plazmolemy w postaci wielkich globul. Przyjmuje się, że wtórna warstwa fibryllarna jest u *Cosmos* siedliskiem enzymów polimeryzujących prekursorów. Trudniejsze jest wyjaśnienie miejsca i szczegółów syntezy SP u *Pinus* i *Lilium*. W tym przypadku sądzi się, że polimeryzacja zachodzi głównie na lamelarnych elementach [22].

Na uwagę zasługują różnice własności fizyko-chemicznych SP wytworzonej w dwóch różnych miejscach tej samej rośliny, w ścianach mikrospor, oraz przez komórki tapetum [21, 42]. Sporopollenina mikrospor (S-SP) jest giętka, oporna na acetolizę, lecz reaguje dodatnio w reakcji PAS. Sporopollenina tapetum (T-SP) jest sztywna, podobnie oporna na acetolizę, reaguje jednak negatywnie w reakcji PAS. Jest możliwe, że S-SP jest wcześniejszym etapem syntezy SP o mniejszym stopniu polimeryzacji niż T-SP. Jest to prawdopodobne, gdyż dojrzewaniu segzyny towarzyszy zmiana reaktywności PAS z dodatniej na ujemną [22].

Ciałka Ubischa

Szczególnym obiektem zawierającym SP są ciała Ubischa [13, 38, 67]. Są one produktem tapetum wydzielniczego [22]. Powstają one z prociał Ubischa o średnicy 0.2—0.3 μm [22] tj. globul lipidowych zawierających jak się sądzi prekursorów SP. Miejscem ich tworzenia jest cytoplazma komórek tapetum, skąd przemieszczane są w kierunku powierzchni komórek. W czasie tej wędrówki powiększają one swoje rozmiary, gęstość elektronową i przedostają się w bliżej nieznanym sposobie w przestrzeń między plazmolemą i SK [13, 45, 46], gdzie dochodzi do szybkiego odkładania elektronowo-gęstego materiału na ich powierzchni [27]. W skład odłożonego materiału wchodzi T-SP [22]. Tworzenie T-SP w prociach Ubischa zbiega się czasowo z rozwojem egzyny ziaren pyłku [36]. Zarówno w przypadku prociał Ubischa jak i ziaren pyłku odkładanie SP zachodzi przy współdziałaniu lamelli o wymiarach błony elementarnej, która ma być obecna na powierzchni tych ciał [21, 22, 28]. Zakłada się, że lamelle biorą udział w polimeryzowaniu prekursorów SP [35, 58]. Jest prawdopodobne, że mogą one być siedliskiem ograniczonych aktywności syntetycznych (enzymów?) związanych z syntezą SP. Materiał części korowej ciałek Ubischa zawiera kwaśne polisacharydy [67]. Znaczne podobieństwo urzeźbienia segzyny ziaren pyłku i materiału powierzchni ciałek Ubischa sugerowało niektórym badaczom istnienie podobnego mechanizmu kontroli tego urzeźbienia w obu wypadkach [67].

Wnętrze ciał Ubischa ma zawierać niespolimeryzowane prekursorów SP obok polisacharydów (pektyn), względnie ich kompleksy z lipidami tj. lipopolisacharydy [38]. Ostatecznie trudno powiedzieć jaki jest mechanizm odkładania SP w korowej

części ciałek Ubischa. Trudno też rozstrzygnąć w jakim stopniu tapetum uczestniczy w syntezie egzyny mikrospory [25, 36, 73].

W świetle aktualnego stanu badań można przyjąć pogląd, że SP powstaje w wyniku polimeryzacji niektórych karotenoidów i ich estrów. Występowanie jej w bezpośredniej bliskości powierzchni komórek zdaje się wskazywać na to, że proces jej powstawania może zachodzić w warunkach tlenowych, lub wymagać dostępu tlenu. Ostatecznie mechanizm procesu powstawania SP wypada zaliczyć do bardzo słabo poznanych. Jego wyjaśnienie wymaga dalszych intensywnych badań.

LITERATURA

- [1] Atkinson A. W., Gunning B. E. S., John P. C. L. 1972. *Planta* (Berl.) 107, 1—32.
- [2] Brooks J., Shaw G. 1968. *Nature*, 219, 532—533.
- [3] Brooks J., Shaw G. 1968. *Nature*, 220, 678—679.
- [4] Brooks J., Shaw G. 1969. *Nature*, 227, 195—196.
- [5] Brooks J., Shaw G. 1971. *Grana*, 11, 1—8.
- [6] Brooks J., Shaw G. 1971. *Pollen Development and Physiology*, ed. J. Heslop—Harrison, Londoa Buttersworths, 99—114.
- [7] Brooks J., Shaw G. 1972. *Chemical Geology*, Elsevier Publishing Comp., Amsterdam, 69—87.
- [8] Brooks J., Shaw G. 1973. *Problemy palinologii*, Izd. Nauka, Moskwa, 80—91.
- [9] Brooks J., Muir M. D. 1971. *Grana*, 11, 9—14.
- [10] Brooks J., Muir M. D. 1974. *Palinologia, Proterofita, Paleofita*, Izd. Nauka, Moskwa, 15—18.
- [11] Brooks J., Muir M. D., Shaw G. 1973. *Nature*, 224, 215—217.
- [12] Burricher E., Amelunxen F., Vahr J., Giele T. 1968. *Zeit. f. Pflanzenphysiol.*, 59, 226—237.
- [13] Carniel K. 1971. *Öster. Bot. Z.*, 119, 496—502.
- [14] Carniel K. 1971. *Öster. Bot. Z.*, 119, 464—474.
- [15] Czygan F. Ch. 1977. Dane nieopublikowane.
- [16] Dickinson H. G. 1970. *Cytobiologie*, 1, 437—439.
- [17] Dickinson H. G. 1971. *Sporopollenin*, ed. G. Shaw, 31-67 and 108—129.
- [18] Dickinson H. G. 1973. *Cytobios*, 8, 25—40.
- [19] Dickinson H. G., Heslop-Harrison J. 1968. *Nature*, 220, 926—927.
- [20] Dickinson H. G., Heslop-Harrison J. 1971. *Cytobios*, 4, 233—243.
- [21] Dickinson H. G., Bell P. R. 1972. *Planta*, 107, 205—215.
- [22] Dickinson H. G. 1976. *The evolutionary significance of the exine*, ed. I. K. Ferguson and J. Muller, Linnean Society Symposium Series No 1.
- [23] Dunbar A. 1973. *Bot. Notiser*, 126, 197—254.
- [24] Dupuis F. 1976. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 123, 243—248.
- [25] Echlin P. 1971. *Sporopollenin*, ed. J. Brooks et al., London.
- [26] Echlin P. 1973. *Pollen; development and physiology*, ed. J. Heslop-Harrison, London, Butterworths.
- [27] Echlin P., Godwin H. 1968. *J. Cell. Sci.*, 3, 161—174.
- [28] Echlin P., Godwin H. 1968. *J. Cell. Sci.*, 3, 175—186.
- [29] Echlin P., Godwin H. 1969. *J. Cell. Sci.*, 5, 459—477.
- [30] Elsik W. C. 1971. *Sporopollenin*, eds.: J. Brooks, P. R. Grant, M. Muir, P. van Gijzel and G. Shaw, London, Acad. Press, 480—511.
- [31] Erdtman G. 1935. *Neue pollenanalytische Untersuchungsmethoden*, Ber. über d. Geobot. Forschungsinstitut Rübel in Zürich, 38—46.
- [32] Erdtman G. 1960. *Sv. Bot. Tidskr.*, 54, 561—564.
- [33] Faegri I., Iversen J. 1964. *Textbook of pollen analysis*. Hafner Publ. Comp., New York.

- [34] Ferguson I. K., Muller J. 1976. The evolutionary significance of the exine, Linnean Society Symposium Series No 1.
- [35] Gabara B. 1976. *Ac. Univ. Lodziensis, Łódź*.
- [36] Gabara B. 1978. *Post. Biol. Komórki*, 5, 233—259.
- [37] Godwin H. Echlin P., Chapman B. 1967. *Roth. Rev. Paleobot., Palynol.*, 3, 181—195.
- [38] Heslop-Harrison J. 1963. *Grana palynol.*, 4, 7—24.
- [39] Heslop-Harrison J. 1964. *Pollen physiology and fertilisation*, ed. H. F. Linskens, North Holland, Amsterdam.
- [40] Heslop-Harrison J. 1968. *Science*, 161, 230—237.
- [41] Heslop-Harrison J. 1968. *New Phytol.*, 67, 779—786.
- [42] Heslop-Harrison J., Dickinson H. G. 1969. *Planta*, 84, 199—214.
- [43] Heslop-Harrison J. 1971. *Sporopollenin*, ed. J. Brooks et al. *Acad. Press, London*, 1—31.
- [44] Heslop-Harrison J. 1973. *Pollen-Development and Physiology*, ed. J. Heslop-Harrison, London, Butterworths, 75—98.
- [45] Hesse M. 1978. *Linzer biol. Beitr.*, 9, 181—201.
- [46] Hesse M. 1978. *Linzer biol. Beitr.*, 9, 237—258.
- [47] Horner H. J. 1968. *Amer. J. Bot.*, 55, 705.
- [48] Kalt P. 1945. *Untersuchungen von Sporopollenin und andere pflanzlichen Membransubstanzen*, Inaugural — dissertation, Wyd. Biel.
- [49] Komarek J. 1971. *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, 39, *Algological Studies* 5, 301—333.
- [50] Komarek J., Ludvik J. 1972. *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, 41, *Algological Studies*, 6, 11—47.
- [51] Kwiatkowski A., Lubiner-Mianowska K. 1957. *Ac. Soc. Bot. Polon.*, vol. XXVI, nr 3, 501—514.
- [52] Larson D. A., Lewis C. W., 1961. *Amer. J. Bot.* 48, 934—943.
- [53] Mc Clymont J. W., Larson D. A. 1964. *Amer. J. Bot.*, 51, 195—200.
- [54] Mephram R. H., Lane G. R. 1968. *Nature*, 219, 916—962.
- [55] Mephram R. H., Lane G. 1969. *Nature*, 221, 282—284.
- [56] Pickett-Heaps J. D. 1970. *Protoplasma (Wien)*, 70, 325—347.
- [57] Potonie R., Rehnelt K. 1971. Aspects of sporin. On the aromatisation of sporin and the hydrogen density of the sporin of carbo niferous lycopsides in sporopollenin, ed. J. Brooks et al., *Acad. Press, London*, 295—304.
- [58] Risueno M. C., Gimenez-Martin G., López-Saèz J. F., Garcia M. I. R. 1969. *Protoplasma*, 67, 361—374.
- [59] Rodkiewicz B. 1973. *Embriologia roślin kwiatowych*, PWN, 27—52.
- [60] Rowley J. R. 1962. *Science*, 137, 526—528.
- [61] Rowley J. R. 1971. Implication on the nature of sporopollenin based upon pollen development, in *Sporopollenin*, ed. J. Brooks et al., London.
- [62] Rowley J. R. 1975. Abstract for Inter. Symposium on gamet Competition in plants and animals: Its biological significance, Lake Como, Italy.
- [63] Rowley J. R. 1975. "33-rd Ann. Proc. electron Microscopy Soc. Amer.", ed. G. W. Baily, Las Vegas, Nevada.
- [64] Rowley J. R. 1975. *J. Ultrastruct. Res.*, 50, 394.
- [65] Rowley J. R. Erdtman G. 1967. *Grana Polynol.*, 7, 518—567.
- [66] Rowley J. R., Southworth D. 1967. *Nature*, 213, 703—704.
- [67] Rowley J. R., Skvarla J. J. 1974. *Pollen et Spores*, 16, 441—448.
- [68] Rowley J. R., Skvarla J. J. 1975. *Amer. J. Bot.*, 62, 479—485.
- [69] Sengupta S., Rowley J. R., 1974. *Grana*, 14, 133—151.
- [70] Shaw G. 1971. *Sporopollenin*, eds. J. Brooks, P. R. Grant, M. Muir, P. van Gijssel and G. Shaw, *Acad. Press, London*, 305—350.
- [71] Shaw G., Yeadon A. 1966. *J. Chem. Soc. (c)*, 16—22.
- [72] Sivera A., Buchen B. 1970. *Protoplasma*, 71, 267—279.
- [73] Sitte P. 1973. *Allgemeine Morphologie der Pflanzenzelle*, in: *Grundlagen der Cytologie*, eds. G. C. Hirsch, H. Ruska, P. Sitto, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- [74] Skvarla J. J., Larson D. A. 1966. *Amer. J. Bot.*, 53, 1112—1125.

- [75] Southworth D. 1969. *Grana palynol.*, 9, 1—3.
- [76] Southworth D., Branton D. 1971. *J. Cell. Sci.*, 9, 193—207.
- [77] Swain T. 1974. *Comprehensive Biochemistry*, ed. M. Florkin and E. H. Stotz, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam, 29, part A, 252—256.
- [78] Traversa A. 1968. *Amer. J. Bot. (Abstr)*, 55, 722.
- [79] Wanka F. 1968. *Protoplasma (Wien)*, 66, 105—130.
- [80] Wolfrom M. L. Thompson A. 1963. Acetolysis, in: *Methods in carbohydrate chemistry*, Acad. Press, New York, London, vol III, 143—149.
- [81] Zetzche F., Huggler K. 1928. *Lieb. Ann.*, 461, 89.
- [82] Zetzche F., Kaelin O. 1931. *Helv. Chim. Acta*, 14, 517—519.
- [83] Zetzche F., Kaelin O. 1932. *Helv. Chim. Acta*, 15, 412—431.
- [84] Zetzche F., Vicari H. 1931. *Helv. Chim. Acta*, 14, 58—62.
- [85] Zetzche F. Kalt P., Lichtl J., Ziegler W. 1937. *J. Praktische Chemie*, 148, 267—286.

Dr JAN BURCZYK

Instytut Zootechniki, ZZD Grodziec Śl., Pracownia Biochemii Stosowanej,
43-400 Cieszyn/Gumna 43