

ROLA Ca^{2+} W PŁCIIOWYM ROZMNAŻANIU ROŚLIN OKRYTONASIENNYCH

Role of Ca^{2+} in sexual reproduction of angiosperm plants

Elżbieta BEDNARSKA, Marta LENARTOWSKA

Abstract. Sexual reproduction includes a number of processes requiring cellular signaling. An important role in the cell signalling both in animals and in plants is played by Ca^{2+} ions. The part of Ca^{2+} in generative reproduction of plants, particularly angiosperms, is still insufficiently understood. However, research in the last decade has supplied some data suggesting that, like in animals, an important role in those processes is played by Ca^{2+} ions. Our paper presents the current state of knowledge concerning the widely understood part of calcium in the generative reproduction of angiosperms. The part of Ca^{2+} in the phenomena specific of that group of organisms have been discussed (such as the production and development of the gametophyte, germination of pollen grains, the directional transport of sperm cells into the embryo sac) as well as processes common to all sexually reproducing organisms: recognition of the gametes and fertilization. Our objective is to show in which phenomena the role of calcium is already understood, in which it needs further studies, and in which it is still in the sphere of hypotheses owing to lack of convincing experimental evidence.

Key words: Ca^{2+} , sexual reproduction, male and female gametophyte, pollen, pollen tube, fertilization.

Prof. dr hab. Elżbieta Bednarska, Zakład Biologii Eksperymentalnej, Instytut Biologii i Ochrony Środowiska, Wyższa Szkoła Pedagogiczna, Słupsk

Dr Marta Lenartowska, Pracownia Biologii Rozwoju, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika, ul. Gagarina 9, 87–100 Toruń¹

WSTĘP

Mechanizmy umożliwiające rozmnażanie płciowe, które ukształtowały się u organizmów jednokomórkowych, odegrały istotną rolę w przyspieszeniu ewolucji Eukaryota. Rozmnażanie włączające rekombinację genów prowadzi bowiem do ogromnej zmienności osobniczej, czego efektem jest lepsze przystosowanie się organizmów do środowiska. Rozmnażanie płciowe obejmuje takie podstawowe procesy jak: (1) wytwarzanie gamet (izogamet, heterogamet), (2) ich rozpoznanie i adhezję, (3) fuzję gamet prowadzącą do powstania zygoty, (4) aktywację zygoty do embriogenezy. Procesy te realizowa-

ne są na drodze często skomplikowanych interakcji komórkowych, obejmujących przepływ informacji między somatycznymi komórkami macierzystymi a komórkami linii generatywnej oraz pomiędzy gametami. Zarówno u roślin, jak i u zwierząt przekazywanie sygnałów międzykomórkowych odbywa się na drodze fosfatydoloinozytolowej z udziałem Ca^{2+} jako wtórnego przekąźnika informacji. Wapniowy system przekazywania informacji był przedmiotem prac przeglądowych zarówno w piśmiennictwie zagranicznym [6, 9, 80] jak i polskim [79, 89, 1]. Dlatego też ograniczamy się do przedstawienia głównych szlaków metabolicznych prowadzących do użycia Ca^{2+} jako wtórnego przekąźnika. Na powierzchni komórek eukariotycznych, w tym prawdopodobnie także u roślin, obecne są

¹ Adres do korespondencji

receptory błonowe, które wiążą cząsteczki sygnałowe. Powstanie kompleksu sygnał-receptor aktywuje znajdujące się po cytozolowej stronie błony tzw. białka G, co ostatecznie prowadzi do rozpadu błonowego fosfatydyloinozytolo (4,5) bifosforan (PIP₂) na inozytolo(1,4,5) trifosforan (IP₃) i 1,2-diacyloglicerol (DG). Uwolniony do cytozolu IP₃ wiąże się z receptorami obecnymi w błonach organelli sekwestrujących Ca²⁺, czego efektem jest otwarcie kanałów wapniowych i mobilizacja wewnątrzkomórkowych magazynów Ca²⁺. Wolne Ca²⁺ łączą się z obecnym w cytozolu białkiem kalmoduliną. Po związaniu z Ca²⁺ kalmodulina aktywuje Ca-kalmodulino zależne kinazy białkowe (CaCAMDPKs). Fosforylacja białek efektorowych przez Ca-CAMDPKs prowadzi w efekcie do odpowiedzi komórkowej. Natomiast drugi produkt rozpadu PIP₂ – DG aktywuje enzym wewnątrznej powierzchni błony komórkowej – Ca-zależną kalmodulino-niezależną C kinazę białkową (PKC). Kinaza ta reguluje szereg białek, w tym błonowe kanały wapniowe, na drodze kalmodulino-niezależnej. Po stymulacji komórki podwyższony poziom Ca²⁺ w cytozolu obniża się dzięki funkcjonowaniu wymiennicy jonowych oraz pomp wapniowych, które transportują nadmiar tych jonów do organelli komórkowych i na zewnątrz błony komórkowej.

Poziom [Ca²⁺]_c reguluje szereg procesów ogólnobiologicznych, występujących także podczas rozmnażania płciowego u roślin. Do zjawisk tych można zaliczyć m.in. przebieg cyklu komórkowego [32], w tym mejozy [78], programowaną śmierć komórki [81], której podlega m.in. tapetum pylnikowe [47], funkcjonowanie cytoszkieletu [39], fuzję membran i wydzielanie komórkowe [13].

U zwierząt rola wapnia w płciowym rozmnażaniu jest dobrze udokumentowana. Wiadomo, że u ssaków jony te regulują takie zjawiska jak: przebieg oogenezy i zapłodnienia [78, 12], pozapłodnieniową aktywację zygoty oraz szybki blok polispermii [49]. Badania ostatniego 10 lecia wskazują, iż również u roślin jony wapnia uczestniczą w fuzji gamet i aktywacji zygoty. Jak do tej pory badania te ograniczają się do roślin niższych, które produkują wolno pływające

gamety [8]. U roślin okrytonasiennych wytwarzanie gametofitu produkującego komórki rozrodcze oraz zapłodnienie odbywają się wewnątrz sporofitowych tkanek roślin macierzystych. Sytuacja ta do lat 90. stanowiła barierę, która uniemożliwiała prowadzenie badań porównywalnych do tych, które wykonywano na materiale zwierzęcym oraz pochodzącym z roślin niższych. Dopiero opracowanie technik izolacji i kultury *in vitro* komórek rozrodczych oraz ich fuzji w warunkach *in vitro* [21] pozwoliło na rozpoczęcie badań procesów towarzyszących płciowemu rozmnażaniu na poziomie molekularnym.

W obecnej pracy podsumowujemy wyniki badań dotyczących szeroko rozumianej roli wapnia w płciowym rozmnażaniu roślin okrytonasiennych. Naszym celem jest pokazanie, w których zjawiskach rola wapnia została już poznana, w których wymaga dalszych badań, a w których pozostaje wciąż w kręgu hipotez z uwagi na brak przekonujących dowodów eksperymentalnych.

CA²⁺ W MIKROSPOROGENEZIE I WYTWARZANIU MĘSKIEGO GAMETOFITU

Dogodnym modelem badawczym, ujawniającym rolę Ca²⁺ w mikrosporogenezie i wytwarzaniu męskiego gametofitu, są pylniki męskopłodnych i męskosterylnych roślin tego samego gatunku. Takie porównawcze badania prowadzone były dotychczas zaledwie u kilku gatunków roślin. Są to: *Gasteria verrucosa* [82], *Allium cepa* [37, 26, 27] i *Oryza sativa* [73]. U wszystkich tych roślin męskosterylność ujawniała się zaburzeniami w rozwoju tapetum, czego efektem był brak prawidłowej interakcji między komórkami linii generatywnej a otaczającą je tkanką odżywczą. U *Gasteria verrucosa* [82] i *Allium cepa* [26] następowała przedwczesna degeneracja tapetum, natomiast u *Oryza sativa* [73] po zakończeniu mejozy tapetum otaczało się specjalną ścianą, która oddzielała je od pozostałych tkanek pylnika.

Udział jonów wapnia w regulacji podziału mejozytycznego tkanki sporogennej jest mało poznany. Dotychczasowe badania pokazały, że po-

ziom wapnia, zarówno związanego z błonami [82] jak i wolnych i słabo związanych Ca^{2+} [26] w dzielących się mikrosporocytach jest stosunkowo niski. Nie stwierdzono istotnych różnic w lokalizacji i poziomie wapnia pomiędzy linią męskopłodną i męskosterylną, co nie jest wynikiem zaskakującym, bowiem u badanych gatunków roślin mikrosporogeneza przebiegała bez zakłóceń. Szerokie badania prowadzone na oocytach ssaków wykazały, że cykl mejotyczny jest regulowany przy udziale wolnych jonów Ca^{2+} . Podwyższenie poziomu cytozolowego $[\text{Ca}^{2+}]$ stanowi niezbędny sygnał do przejścia z I profazy mejotycznej do metafazy, czyli do przełamania tzw. bloku diplotenowego, a także do zakończenia II podziału mejotycznego [7, 12]. Zatrzymanie mejozy w stadium diplotenu znane jest również u roślin, np. u *Larix decidua* mikrosporocyty pozostają w stadium diplotenu przez około pół roku [28]. Dotychczasowe badania, aczkolwiek nie wykluczają wapniowej regulacji cyklu mejotycznego u roślin, nie pozwalają na ustosunkowanie się do wyników uzyskanych na materiale zwierzęcym. Poznanie roli wapnia w regulacji mejozy u roślin okrytonasiennych wymaga bowiem zastosowania bardziej precyzyjnych metod badawczych, m.in. pomiaru cytozolowego poziomu Ca^{2+} w dzielących się mikrosporocytach za pomocą indykatorów fluorescencyjnych.

Nieco lepiej poznana jest rola wapnia w postmeiotycznym rozwoju komórek męskiej linii generatywnej, tj. mikrospor i ziaren pyłkowych. Porównanie metabolizmu wapniowego w męskopłodnym i męskosterylnym pylniku wskazuje, iż u przebadanych gatunków wytwarzanie żywotnych ziaren pyłkowych wymaga optymalnego poziomu Ca^{2+} w komorze pylnika oraz regulowanego transportu tych jonów do mikrospor i dojrzewających ziaren pyłkowych. Podstawową rolę w tych zjawiskach odgrywa prawidłowa interakcja między tapetum a różnicującymi się komórkami linii generatywnej. Badania przeprowadzone u *Gasteria verrucosa* [82] oraz u *Allium cepa* [26] wykazały akumulację jonów Ca^{2+} w dojrzewającym pylniku. W okresie od stadium diad do tetrad następuje silny wzrost poziomu wapnia związanego z błonami

w komórkach tapetum. Wysoki poziom tej puli wapnia utrzymuje się w tapetum przez cały dalszy okres funkcjonowania tej tkanki. Pomiar ilościowe intensywności fluorescencji kompleksu Ca-CTC w pylniku *Gasteria verrucosa* ujawniły, że obniżaniu poziomu wapnia w deintegrującym tapetum towarzyszył wzrost poziomu tych jonów w dojrzewających ziarnach pyłkowych [82]. Wskazuje to, iż zmagazynowane w tapetum jony Ca^{2+} są następnie transportowane do komory pylnika oraz dojrzewających mikrospor i ziaren pyłkowych. Bezpośrednich dowodów transportu jonów Ca^{2+} z somatycznych tkanek pylnika, szczególnie tapetum, do ziaren pyłkowych dostarczyły badania u *Petunia hybrida* z użyciem $^{45}\text{Ca}^{2+}$ [4]. W warunkach *semi in vivo* pobierane przez wiązkę przewodzącą nitki przecikowej pylnika $^{45}\text{Ca}^{2+}$ akumulują się głównie w tapetum oraz na powierzchni ziaren pyłkowych.

Mechanizmy postmeiotycznego transportu Ca^{2+} z tapetum do mikrospor i ziaren pyłkowych nie są do końca wyjaśnione. Zarówno u *Allium cepa* [36] jak i u *Oryza sativa* [73] obecność jonów wapniowych stwierdzono na powierzchni orbikul – zawierających sporopoleninę struktur wydzielanych z tapetum do komory pylnika po zakończeniu mikrosporogenezy. Jest to okres uwalniania mikrospor ze ściany kalozowej, kiedy otoczone są one jeszcze niekompletną sporodermą i mogą być bardzo wrażliwe na poziom Ca^{2+} w środowisku swego rozwoju. Wielu badaczy [14, 50], aczkolwiek nie wszyscy [46], uważa, że orbikule włączane są do ściany mikrospor. Można więc sugerować, że struktury te uczestniczą w kontrolowanym transporcie wapnia z tapetum do dojrzewających mikrospor. Podczas rozwoju ziaren pyłkowych resztkowe tapetum u wielu gatunków roślin tworzy tzw. opłaszczenie (ang. pollen coat), osadzone na powierzchni sporodermi [14, 59]. Badania u *Petunia hybrida* [4] oraz *Allium cepa* [26] wykazały, że opłaszczenie również jest miejscem występowania Ca^{2+} . Osadzanie opłaszczczenia na powierzchni sporodermi może zatem stanowić kolejny mechanizm transportu Ca^{2+} do dojrzewającego gametofitu męskiego.

Dowodów na to, iż poziom Ca^{2+} w komorze

pylnika oraz mechanizmy kontrolowanego transportu tych jonów z tapetum do komórek linii generatywnej odgrywają ważną rolę w wytwarzaniu żywotnych ziaren pyłkowych, dostarczyły badania linii męskosterylnych. U *Allium cepa* gwałtownej, przedwczesnej degeneracji tej tkanki towarzyszy niekontrolowany wyrzut jonów Ca^{2+} [36]. Zatem mikrospory są uwalniane do środowiska o ponad optymalnym poziomie Ca^{2+} . Natomiast u *Oryza sativa* z powodu obecności specjalnej ściany wokół tapetum jony Ca^{2+} nie mogą być transportowane do komory pylnika [73]. Prowadzi to do obniżenia poziomu Ca^{2+} w środowisku, w którym dojrzewają mikrospory. Jednakże zarówno w warunkach ponad optymalnego, jak i poniżej optymalnego poziomu Ca^{2+} w komorze pylnika, rozwój mikrospor ulega zaburzeniu i dochodzi do aborcji pyłku.

Procesem zależnym od wapnia wydaje się być również synteza ściany komórkowej wokół zamkniętych w otoczce kalozowej mikrospor. Badania u *Allium cepa* wykazały występowanie wolnych i słabo związanych Ca^{2+} w związku z podobnowo zlokalizowanymi pęcherzykami wydzielniczymi oraz plazmalemą mikrospor w okresie syntezy sporodermi [26]. Taka lokalizacja Ca^{2+} odzwierciedla zapewne występowanie podwyższonego poziomu tych jonów w strefie sekrecji materiału ścianowego. Od dawna wiadomo bowiem, że egzocytoza wymaga wysokiego, milimolarnego stężenia Ca^{2+} [13].

Wapń odgrywa też ważną rolę w asymetrycznym podziale mikrospory i dojrzewaniu ziarna pyłkowego. U *Nicotiana tabacum* Zonia i Tupý [88] wykazali, że odpowiedni poziom i rozmieszczenie Ca^{2+} w mikrosporze są konieczne do powstania dwukomórkowego ziarna pyłku. Asymetryczny podział mikrospory poprzedzony był polaryzacją rozmieszczenia jonów wapniowych, które w wyższym stężeniu gromadziły się na generatywnym biegunie komórki. Eksperymentalne zaburzenie polaryzacji Ca^{2+} hamowało podział mikrospory i ziarno pyłkowe nie powstawało. Jak już stwierdzono wyżej podczas dojrzewania ziarno pyłkowe akumuluje jony Ca^{2+} [77, 4]. Szczegółowe badania dystrybucji tych jonów w różnicującym się ziarnie pyłko-

wym *Chlorophytum elatum* ujawniły, że pobierane Ca^{2+} są odmiennie przechowywane w komórce wegetatywnej i generatywnej [10, 29]. W komórce wegetatywnej poziom wolnych i słabo związanych Ca^{2+} był niski; jony te były silnie związane na terenie tzw. globoidów występujących w niewielkich wakuolach komórki [10]. Natomiast w komórce generatywnej lokalizowano przede wszystkim słabo związane Ca^{2+} [29]. Niewykluczone, że różny poziom wolnych Ca^{2+} w siostrzanych komórkach pyłkowych jest odpowiedzialny za odmienny sposób ich różnicowania [29].

Drugim znanym elementem systemu wapniowego, który niewątpliwie uczestniczy w procesie powstawania i rozwoju męskiego gametofitu jest kalmodulina. Zarówno metodą fluorescencyjną z użyciem flufenazyny, która wiąże się z aktywną formą kalmoduliny [92, 77] jak i immunocytochemiczną [27], jej obecność ujawniono w komórkach linii generatywnej oraz na terenie tapetum pylnikowego. W dzielących się mikrosporocytach *Gasteria verrucosa* [82] oraz *Allium cepa* [27], kalmodulina wykazywała głównie rozproszoną cytoplazmatyczną lokalizację. Jej obecność stwierdzano także na terenie jąder w okresie wczesnej profazy I [27] oraz w otoczce jądrowej młodych mikrospor [82]. Obecność kalmoduliny w ziarnach pyłkowych została udokumentowana u wielu gatunków roślin: *Brassica campestris* [48], *Gasteria verrucosa* [82, 77], *Nicotiana tabacum* [74, 75], *Corylus avellana* [69], *Agapanthus umbellatus* [58] oraz *Allium cepa* [27]. Występowania tego białka w męskim gametoficie wydaje się być zatem powszechne. Jak pokazują badania cytologiczne różnice mogą dotyczyć lokalizacji kalmoduliny w dojrzałym ziarnie pyłku. U *Gasteria verrucosa* [77] białko to ujawnia rozproszoną lokalizację na terenie całej cytoplazmy pyłku. Natomiast u *Allium cepa* [27] tuż przed antezą podwyższony poziom kalmoduliny obserwowano na jednym z biegunów ziarna pyłkowego. U *Gasteria verrucosa* [77], podobnie jak u *Nicotiana tabacum* [74, 75], bogaty w kalmodulinę okołoaperturowy biegun pojawia się dopiero podczas rehydratacji pyłku. Polarne rozmieszczenie kalmoduliny w ziarnie pyłkowym ma za-

pewne związku z formowaniem się bieguna komórki wegetatywnej, który po zapyleniu przekształca się w wierzchołek łagiewki pyłkowej.

Ca^{2+} W KIELKOWANIU ZIAREN PYŁKOWYCH I WZROŚCIE ŁAGIEWEK PYŁKOWYCH

Trwające od lat 60. badania wykazały, że jony wapniowe odgrywają podstawową rolę w regulacji kielkowania ziaren pyłkowych i wzrostu łagiewek pyłkowych. Brewbaker i Kwack już w 1963 roku stwierdzili, że optymalne stężenie Ca^{2+} w pożywce jest niezbędne podczas tych procesów w warunkach *in vitro* [7]. Zastosowanie radioaktywnego wapnia ujawniło, że rosnące łagiewki pyłkowe pobierają Ca^{2+} z pożywki. Egzogenne Ca^{2+} są następnie akumulowane w jej wierzchołku [35, 2]. Dalsze badania, prowadzone coraz bardziej precyzyjnymi metodami wykazały, że w kielkujących ziarnach pyłkowych i rosnących łagiewkach pyłkowych występuje specyficzny gradient wapnia [65, 63, 55, 61]. W kielkującym ziarnie pyłkowym początkowo równomiernie rozmieszczone jony wapnia ulegają przemieszczeniu – wyższe ich stężenie znajduje się w okolicy aperturowej, a następnie w wierzchołku łagiewki pyłkowej przez cały okres jej wzrostu (ang. tip-to-base gradient Ca^{2+}). Stabilność gradientu wapnia warunkuje prawidłowy wzrost łagiewki pyłkowej. Efektem jego eksperymentalnego zaburzenia, np. przez aplikację buforów chelatujących Ca^{2+} , są perturbacje wierzchołkowego wzrostu łagiewki pyłkowej [57, 61], aż do jego całkowitego zahamowania [2, 24].

Podwyższony poziom wapnia w wierzchołku łagiewki pyłkowej obejmuje zarówno Ca^{2+} związane z błonami [65] jak i wolne jony Ca^{2+} [66, 63, 57, 51, 62]. Badania z użyciem indykatora Fura 2-dextranu wykazały, że stężenie wolnych jonów wapniowych w łagiewkach pyłkowych *Lilium longiflorum* waha się od około $2\text{ }\mu\text{M}$ na szczycie wierzchołka do około $0.5\text{ }\mu\text{M}$ w odległości $5\text{ }\mu\text{m}$ od niego i tylko $0.2\text{ }\mu\text{M}$ $40\text{ }\mu\text{m}$ poniżej szczytu łagiewki [62]. Poziom $[\text{Ca}^{2+}]_c$ w wierzchołku rosnącej łagiewki nie jest absolutnie stały. U *Lilium longiflorum* rejestrowano zarówno szybkie oscylacje Ca^{2+} (w łagiewkach

dłuższych niż $700\text{ }\mu\text{m}$ co ok. 23 sekundy, w łagiewkach krótszych o zmiennej fluktuacji), jak i wolną falę wapniową przemieszczającą się od strefy podwierzchołkowej do szczytu łagiewki w ok. 2 min. interwałach [62]. Oscylacje poziomu Ca^{2+} w łagiewce towarzyszą zmianom tempa jej wzrostu – podwyższaniu poziomu Ca^{2+} towarzyszy pulsowy wzrost wierzchołka łagiewki [56].

Badania ostatnich lat wskazują, że Ca^{2+} w łagiewce pyłkowej regulują funkcjonowanie cytoszkieletu [39] oraz proces egzocytozy [33], a lokalne zmiany poziomu tych jonów na wierzchołku odpowiedzialne są za reorientację kierunku jej wzrostu [51, 52]. Stosując jonoforetyczne mikroiniekcje związków wpływających na poziom $[\text{Ca}^{2+}]_c$ w określonych obszarach wierzchołka łagiewki *Agapanthus umbellatus* udokumentowano, że rośnie ona w kierunku, który wyznacza podwyższony poziom cytozolowego Ca^{2+} [52]. Wzrost poziomu $[\text{Ca}^{2+}]_c$ generowany może być IP_3 , co wskazuje iż proces ten regulowany jest drogą fosfoinozitolową [24].

Rola kalmoduliny w procesach pozapyleniowego rozwoju ziaren pyłkowych jest zdecydowanie mniej poznana. Metodami fluorescencyjnymi obecność tego białka stwierdzono w kielkujących *in vitro* ziarnach pyłkowych i łagiewkach pyłkowych *Lilium longiflorum* [30], *Gasteria verrucosa* [77] oraz *Nicotiana tabacum* [74]. W rosnących łagiewkach obecny jest gradient kalmoduliny – najwyższe stężenie tego białka występuje na jej wierzchołku [74, 75]. Ostatnie badania u *Agapanthus umbellatus* pokazały, że w cytoplazmie wierzchołka łagiewki podwyższony poziom kalmoduliny tworzy strukturę V-kształtnego kołnierza poniżej regionu apikalnego [58]. Metodą immunocytochemiczną ujawniono, że białko to wiąże się z pęcherzykami sekrecyjnymi, występującymi w cytoplazmie wierzchołkowej łagiewki pyłkowej [45]. Wiadomo, że kalmodulina jest niezbędna w procesach kielkowania ziaren pyłkowych i wzroście łagiewek pyłkowych. Zastosowanie antagonistów tego białka powodowało rozpad tip-to-base gradientu Ca^{2+} i hamowało wzrost łagiewek pyłkowych [58]. Pozostaje jednakże niewyjaśnione, które z białek włączonych we wzrost

łagiewek są regulowane na drodze Ca/kalmodulino-zależnej. Bierze się pod uwagę regulację kalmodulino-zależnej pompy Ca^{2+} oraz udział w funkcjonowaniu cytoszkieletu poprzez bezpośrednią interakcję z białkami miozyny i aktyny [58].

ROLA TIP-TO-BASE GRADIENTU Ca^{2+} W DOJRZEWANIU KOMÓREK PLEMNIKOWYCH

Komórki plemnikowe są transportowane w podwierzchołkowej cytoplazmie, gdzie poziom Ca^{2+} jest ok. 10 krotnie niższy aniżeli na wierzchołku. U *Zea mays* komórki plemnikowe, które są w asocjacji z jądrem sąsiadującej komórki wegetatywnej, tj. pozostają w męskiej jednostce rozrodczej (ang. MGU), znajdują się w odległości ok. 90 mM od szczytu łagiewki [86]. Transport komórek plemnikowych w strefie obniżonego poziomu Ca^{2+} wydaje się mieć istotny, biologiczny sens. Badania ostatnich lat wskazują, że jakość błon komórek plemnikowych jest zależna od poziomu Ca^{2+} [87]. Przechowywanie wyizolowanych komórek plemnikowych w BKS – roztworze Brewbakera i Kwacka, zawierającym m.in. 1.3 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)$ prowadzi do przedwczesnej utraty ich żywotności. Efekt ten był jeszcze bardziej widoczny po traktowaniu komórek plemnikowych jonoforem A23187, który podwyższa wewnątrzkomórkowy poziom Ca^{2+} . Obniżenie poziomu $[\text{Ca}^{2+}]_c$ za pomocą EGTA również prowadziło do utraty żywotności komórek. Rezultaty te wskazują, że wapń jest niezbędny do utrzymania integralności błony komórek plemnikowych, lecz w zbyt wysokim, ponadoptimalnym stężeniu może prowadzić do jej destabilizacji. Szczegółowe obserwacje ujawniły, że umieszczenie wyizolowanych z ziaren pyłkowych komórek plemnikowych *Zea mays* w środowisku zawierającym milimolarne stężenie Ca^{2+} prowadziło do ich aglutynacji, tworzenia mostów cytoplazmatycznych i ostatecznie fuzji. Wynikiem tego procesu było powstanie dwu – i wielojądrowych komórek [86]. Dalsze badania prowadzone w kulturach *in vivo-in vitro* u *Nicotiana tabacum* potwierdziły, że jony Ca^{2+} indukują samofuzję komórek plemnikowych [72]. Wrażliwość na Ca^{2+} zmniejsza się

wraz z wiekiem kultury, co wskazuje, iż podczas dojrzewania komórki plemnikowe wykształcają mechanizmy zapobiegające samofuzji. Tian i Russell [72] uważają, iż jednym z tych mechanizmów może być synteza materiału polisacharydowego w formie wysoko zmodyfikowanej periplazmy na powierzchni komórek plemnikowych. Fuzję komórek plemnikowych indukowała bowiem obecność celulazy i pektynazy. Nie wykluczone, że dojrzewanie komórek plemnikowych obejmuje też syntezę i wydzielanie peryferycznych glikoprotein, których obecność wykazano na powierzchni plazmalemy tych komórek u *Zea mays* [84]. Zatem wydaje się, iż lokalizacja MGU w środowisku o niskim poziomie Ca^{2+} oraz modyfikacja powierzchni dojrzewających komórek plemnikowych zapobiega ich spontanicznej fuzji podczas transportu w łagiewce pyłkowej.

WAPŃ JAKO CZYNNIK CHEMOTROPOWY DLA ROSNĄCYCH ŁAGIEWEK PYŁKOWYCH

W latach 60. w oparciu o badania u *Antirrhinum majus* zaproponowano, że wapń pełni funkcję czynnika chemotropowego – łagiewki pyłkowe rosną w kierunku wyższego stężenia Ca^{2+} [53]. Inne badania, prowadzone na różnych gatunkach roślin, dawały jednakże bardzo niejednoznaczne wyniki [67, 25] – teza ta pozostała kontrowersyjna. Odpowiedź łagiewek pyłkowych na Ca^{2+} została ponownie przetestowana w 1992 roku u gruszy. W warunkach *in vitro* wykazano, że dodatni chemotropizm tych komórek ujawnia się tylko do wapnia występującego w żelu pektynowym [64]. Jony wapnia pochodzące ze związków nieorganicznych ($[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2]$, CaCl_2 i CaCO_3) nie miały wpływu na kierunek elongacji łagiewek pyłkowych. Badania te sugerowały, że w reorientacji wzrostu męskiego gametofitu w słupku krytyczną rolę odgrywa nie wzrastające stężenie wapnia na drodze znamię – zalążnia [54], lecz pozapyleńniowe uwalnianie tych jonów z substratów obecnych w naturalnym środowisku wzrostu łagiewek pyłkowych. Hipoteza ta stała się wielce prawdopodobna w świetle naszych badań u *Petunia hybrida* [42, 44]. Stosując piroantymonia-

nową metodę subkomórkowej lokalizacji wapnia stwierdzono, że zapylenie i wzrost łagiewek pyłkowych indukują wzrost poziomu Ca^{2+} w matriks międzykomórkowej szlaku transmisyjnego słupka [43]. Wzrostowi poziomu Ca^{2+} w naturalnym środowisku rozwoju męskiego gametofitu towarzyszy liza obecnych tam deestryfikowanych pektyn [42, 44], które znane są jako związki silnie wiążące jony wapnia [11]. Na podstawie przeprowadzonych badań własnych sądzimy, że deestryfikowane pektyny stanowią naturalny magazyn Ca^{2+} w matriks międzykomórkowej tkanki transmisyjnej szyjki słupka. Uwalnianie jonów Ca^{2+} jest odpowiedzią na zapylenie i wzrost łagiewek pyłkowych w słupku. Dodatni chemotropizm łagiewek pyłkowych do Ca^{2+} , prawdopodobnie pochodzących z pektynianów wapnia, wydaje się mieć miejsce także podczas ich wzrostu na placencie. Badania u *Petunia hybrida* metodą chlorotetracyklinową [3] i piroantymonianową [5] oraz u *Oenothera hookeri* za pomocą alizaryny S [20] wykazały, że w placencie występuje podwyższony poziom wapnia. Głównym miejscem lokalizacji Ca^{2+} jest zewnętrzna powierzchnia ściany komórek epidermalnych [5]. W ścianie tej ostatnio zlokalizowaliśmy wysoki poziom deestryfikowanych pektyn (Bednarska i wsp. nie publ.). Wskazuje to, iż powierzchnia placenty wytwarza środowisko podobne do tego, jakie występuje w matriks międzykomórkowej szlaku transmisyjnego szyjki słupka. U niektórych roślin, np. u gruszy [16] oraz *Oenothera hookeri* [20] w mikropyle zalążka obecne są zawierające wapń kwaśne polisacharydy. Zatem pektyniany wapnia mogą stanowić czynnik chemotropowy również w ukierunkowaniu wzrostu łagiewek do mikropyle.

Ca^{2+} W ROZWOJU ŻEŃSKIEGO GAMETOFITU I ZAPŁODNIENIU

Rola wapnia w megasporogenezie i powstawaniu żeńskiego gametofitu nie była badana. Istnieje natomiast szereg doniesień dotyczących obecności wapnia w zalążku i woreczku zalążkowym. Celem tych badań jest poznanie roli Ca^{2+} w: (1) przekazywaniu sygnałów do łagiew-

wek pyłkowych podczas ich wrastania do zalążka, (2) zakończeniu fazy progamicznej oraz (3) zapobieganiu polispermii.

WAPŃ W NIEZAPŁODNIONYM ZALĄŻKU

Wapń w zalążku i woreczku zalążkowym badano za pomocą energo-dyspersyjnej mikroanalizy rtg, pozwalającej na określenie poziomu całkowitego wapnia [15, 16], techniką chlorotetracyklinową ujawniającą wapń związany z błonami [34, 76, 3] oraz metodą piroantymonianową, za pomocą której lokalizowano wolne i słabo związane jony Ca^{2+} [15, 16, 18, 19, 31, 5, 71]. Stwierdzono, że tkanki zalążka są miejscem występowania stosunkowo wysokiego poziomu całkowitego wapnia [15, 16], wapnia związanego z błonami [3] oraz wolnych Ca^{2+} [16, 5, 71]. Badania u *Oenothera* ujawniły, że szczególnym miejscem akumulacji wapnia jest mikropyle zalążka [20]. Ich nagromadzenie jest związane z receptywnością zalążka – wapń stwierdzono tylko w mikropyle żeńsko-płodnych receptywnych zalążków *Oenothera hookeri*. W zalążkach żeńsko-sterylnych roślin *Oenothera mut. brevistilis* metodą alizarynową nie ujawniano obecności wapnia. Badania techniką piroantymonianową u gruszy pokazały, że podwyższony poziom Ca^{2+} występuje zarówno w kanale mikropylarnym, jak i w ścianach komórek otaczających kanał [16]. Obecność Ca^{2+} w tym regionie zalążka uważana jest za ewentualny czynnik chemotropowy, ukierunkowujący wzrost łagiewki pyłkowej do mikropyle.

Miejscem akumulacji Ca^{2+} w zalążku są też komórki ośrodka [71]. Na krótko przed osiągnięciem dojrzałości przez woreczek zalążkowy liczne precypitaty ujawniające Ca^{2+} metodą piroantymonianową lokalizowano na terenie rozbudowanych ścian komórek przylegających do mikropylarnego bieguna woreczka zalążkowego [5, 71]. Sugeruje to apoplastyczny transport Ca^{2+} z somatycznych komórek ośrodka do mikropylarnego bieguna woreczka zalążkowego.

Gromadzenie wapnia w woreczku zalążkowym następuje na krótko przed wrośnięciem tam łagiewki pyłkowej. W woreczkach zalążkowych wszystkich dotychczas przebadanych ga-

tunków roślin najwyższy poziom wapnia stwierdzono na terenie synergidy. Akumulacja wolnych i słabo związanych Ca^{2+} albo jest podobna w obydwu synergidach, np. u *Triticum aestivum* [15], albo jedna z nich wykazuje wyższy poziom tych jonów, np. u *Helianthus annuus* [31]. Szczególne nagromadzenie wapnia obserwuje się na terenie aparatu włókienkowego synergidy [15, 16, 71]. Badania przeprowadzone metodą CTC ujawniły, że u *Nicotiana tabacum* i *Petunia hybrida* podwyższony poziom wapnia związanego z błonami występuje tylko w synergidzie docelowej, do której wrośnie łagiewka pyłkowa [34, 76]. Wskazuje to, iż podwyższony poziom wapnia jest znacznikiem jej receptywności. U *Nicotiana tabacum* degeneracja jednej z synergid jest przypadkowa [34]. Natomiast u *Helianthus annuus* receptywną synergidą staje się zawsze synergida położona od strony sznureczka [85]. Wzrost poziomu wapnia w docelowej synergidzie, któremu towarzyszą objawy degeneracji jej cytoplazmy uważany jest za zjawisko fizjologiczne, przygotowujące aparat jajowy na przyjęcie łagiewki pyłkowej [16, 18, 71].

Poziom wapnia na biegunie chalazalnym woreczka zalążkowego jest różny u różnych gatunków roślin i wydaje się być związany z funkcjonowaniem antypod. U *Petunia hybrida*, gdzie antypody degenerują przed zapłodnieniem, nagromadzenie lokalizowanych metodą piroantymonianową wolnych i słabo związanych Ca^{2+} obserwowano przede wszystkim na terenie ich ścian komórkowych. Wskazuje to na udział antypod w apoplastycznym transporcie Ca^{2+} do komórki centralnej [5]. Natomiast w niezdegenerowanych antypodach *Nicotiana tabacum* poziom Ca^{2+} był niski – stwierdzono tam tylko pojedyncze precypitaty piroantymonianu wapnia [71].

UDZIAŁ WAPNIA W ZAPŁODNIENIU

Transportująca komórki plemnikowe łagiewka pyłkowa wrasta do docelowej synergidy. Wysoki poziom Ca^{2+} w tej komórce uważany jest za czynnik indukujący pęknięcie wierzchołka łagiewki pyłkowej i uwolnienie komórek plemnikowych. W początkowym okresie po uwol-

nieniu komórki plemnikowe pozostają jeszcze w męskiej jednostce rozrodczej (MGU), co zgodnie z hipotezą Tian i Russella [72] może zapobiegać ich samofuzji. Mające nastąpić wkrótce zapłodnienie wymaga jednakże procesu zwanego u zwierząt kapacytacją, który polega na odpowiedniej modyfikacji powierzchni plemników, tak aby mogło dojść do fuzji męskiej i żeńskiej gamety. Pierwszym etapem przygotowania komórek plemnikowych do zapłodnienia jest ich uwolnienie z MGU, po którym prawdopodobnie następują zmiany powierzchni błony komórkowej, np. enzymatyczna liza periplazmalemowych polisacharydów i zrzućenie peryferycznych glikoprotein. Za procesy te wydaje się być odpowiedzialne środowisko synergidy [71]). Przygotowanie komórek plemnikowych do zapłodnienia prawdopodobnie obejmuje też wzrost poziomu cytoplazmatycznego Ca^{2+} oraz białek wiążących wapń. U *Zea mays* stwierdzono, że wyizolowane komórki plemnikowe pobierają Ca^{2+} dzięki aktywności potencjało-zależnych kanałów wapniowych [87]. Poziom Ca^{2+} odgrywa też ważną rolę w syntezie białek wiążących wapń – kalmoduliny i kalretikuliny. W komórkach plemnikowych kukurydzy przechowywanych 3 godz. w obecności 1 mM Ca^{2+} , poziom kalmoduliny i kalretikuliny był wyższy o przeszło 30% aniżeli tuż po izolacji z ziaren pyłkowych [83]. Ostatecznie wolne komórki plemnikowe znajdują się w stworzonym przez degenerującą synergidę środowisku zawierającym wysoki poziom Ca^{2+} . Uważa się, iż w tych warunkach dochodzi do zmiany właściwości błon komórek plemnikowych, co umożliwia im fuzję z komórkami docelowymi. Indukcyjna rola Ca^{2+} w fuzji komórki plemnikowej i jajowej została udokumentowana eksperymentalnie podczas zapłodnienia *in vitro*. W środowisku zawierającym milimolarne stężenie Ca^{2+} , a więc w warunkach jakie występują *in vivo*, dochodzi do specyficznej fuzji między żeńskimi i męskimi gametami *Zea mays* [40, 23]. W warunkach *in vitro* adhezja komórek plemnikowych do żeńskich komórek docelowych trwa kilka minut, sama fuzja – tylko kilka sekund [22, 40]. U zwierząt i glonów za adhezję i rozpoznanie między gametami odpowiedzialne są powierzchniowe

glikoproteiny, włączające przekazywanie informacji na drodze wapniowej [38]. Badania frakcji błonowej izolowanej z komórek plemnikowych *Zea mays* pokazały, że na ich powierzchni obecne są wiążące lektynę glikoproteiny, zarówno peryferyczne jak i integralnie związane z błoną [84]. Do tej pory nie stwierdzono jednakże, czy uczestniczą one w adhezji i fuzji gamet. Badania eksperymentalne – prowadzone głównie metodą elektrofuzji – nie potwierdzają, iż u roślin kwiatowych adhezja i fuzja gamet jest predeterminowana – jak to sugerowały badania u *Plumbago zeylanika* [68], ani też że jest specyficzna gatunkowo [23].

Po zapłodnieniu obserwuje się redystrybucję Ca^{2+} na terenie woreczka zalążkowego oraz zalążka [17, 71]. U pszenicy zapłodnienie inicjuje usuwanie wapnia na zewnątrz synergidy, do której wrosła łagiewka pyłkowa. Chaubal i Reger uważają, że może to stanowić mechanizm blokujący wrastanie kolejnych łagiewek do woreczka zalążkowego [17]. U *Nicotiana tabacum* po zapłodnieniu obserwowano spadek poziomu Ca^{2+} zarówno w synergidach i aparacie fibrylarnym jak i w mikropyle zalążka [71]. Zalążek pozbawiony wysokiego poziomu wapnia w mikropyle traci swą receptywność.

U zwierząt zapłodnienie powoduje krótkotrwałą, przejściową wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_c$ w komórce jajowej, tzw. falę wapniową, która m.in. uruchamia szybki blok polispermii oraz inicjuje aktywację nowopowstałej zygoty do embriogenezy [49, 12]. Proces ten, w którym uczestniczy IP_3 zależne uwalnianie Ca^{2+} z ER, opisano także podczas przeprowadzonego w warunkach *in vitro* zapłodnienia roślin niższych, np. u *Chlamydomonas eugametois* [60] oraz *Fucus* [8]. Niewykluczone, że zjawisko to występuje również podczas zapłodnienia u roślin kwiatowych, jednakże do tej pory brak na ten temat jakichkolwiek doniesień naukowych. Poziom lokalizowanych metodą piroantymonianową wolnych i słabo związanych Ca^{2+} w komórce jajowej *Nicotiana tabacum* jest podobnie niski przed i po zapłodnieniu [71]. Wskazuje to, iż jony Ca^{2+} występują tam głównie w formie związanej, prawdopodobnie na terenie organelli cytoplazmatycznych. Ewentualne ujawnienie pozapłodnie-

niowej fali wapniowej wymaga przeprowadzenia precyzyjnych badań z użyciem indykatorów $[\text{Ca}^{2+}]_c$ podczas kontrolowanego zapłodnienia w warunkach *in vitro*.

Do tej pory niewyjaśnionym zjawiskiem pozostaje udział Ca^{2+} w szybkim bloku polispermii. W obecności 5 mM Ca^{2+} dopiero po 10–45 min. od inicjacji zapłodnienia komórka jajowa kukurydzy staje się odporna na fuzję z kolejną komórką plemnikową [23]. Po tak długim czasie proces ten należy uznać za tzw. wolny blok polispermii, który u innych organizmów nie jest wystarczający do zapobiegania wnikaniu kolejnych plemników do jaja [8]. Ten wolny blok polispermii u roślin kwiatowych jest prawdopodobnie efektem trwającej kilka minut syntezy ciągłej ściany wokół zapłodnionej komórki jajowej [41].

PODSUMOWANIE

Badania ostatniego 10-lecia dostarczyły szeregu danych, iż w procesach generatywnego rozmnażania roślin okrytonasiennych ważną rolę odgrywają jony Ca^{2+} . W porównaniu z badaniami u zwierząt nasza wiedza na ten temat jest mniejsza. Dotychczas brak informacji na temat roli jonów wapnia w regulacji cyklu mejotycznego, tj. podczas wytwarzania mikro- i megaspor. Dalszych badań wymaga wyjaśnienie roli tych jonów w interakcji pomiędzy somatycznymi i generatywnymi komórkami podczas wytwarzania męskiego i żeńskiego gametofitu. Z uwagi na trudności techniczne, wciąż niepełne są dane dotyczące roli wapnia i białek wiążących wapń podczas rozwoju łagiewki pyłkowej w szlaku transmisyjnym słupka.

Opracowanie technik zapłodnienia w warunkach *in vitro* stworzyło możliwości podjęcia badań nad udziałem elementów systemu wapniowego w przekazywaniu sygnałów podczas zapłodnienia, aktywacji zygoty i szybkim bloku polispermii. Zjawiska te zostały już dobrze udokumentowane u zwierząt i roślin niższych.

Najlepiej poznana jest rola jonów wapnia i funkcjonowanie elementów fosfoinozytolowej drogi transdukcji sygnałów podczas wzrostu łagiewek pyłkowych w warunkach *in vitro*. Wynika to z faktu, iż komórki te stanowią wyjątkowo

dogodny model do wszelkiego typu badań eksperymentalnych. Łatwe w kulturze *in vitro*, charakteryzujące się bardzo szybkim, spolaryzowanym wzrostem, łagiewki pyłkowe wykorzystywane są do badań zmierzających do poznania problematyki funkcjonowania systemu wapniowego u roślin. Szczegółowe wyniki tych badań zostaną przedstawione w oddzielnej publikacji.

PODZIĘKOWANIA

Druk pracy sponsorowany z funduszu badań statutowych Instytutu Biologii i Ochrony Środowiska Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Słupsku.

LITERATURA

- [1] BARAŃSKA J. 1998. Przekazywanie sygnałów w komórce roślinnej; receptory błony komórkowej. *Post. Biochem.* **44**: 201–208.
- [2] BEDNARSKA E. 1989. The effect of exogenous Ca^{2+} ions on pollen grain germination and pollen tube growth – investigation with the use of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ and Verapamil, La^{3+} and ruthenium red. *Sex. Plant. Reprod.* **2**: 53–58.4.
- [3] BEDNARSKA E. 1995. Localization of membrane-associated calcium in unpollinated and pollinated pistil of *Petunia hybrida* Hort. *Acta Soc. Bot. Pol.* **64**: 19–24.
- [4] BEDNARSKA E., BUTOWT R. 1994. Calcium in pollen-pistil interaction in *Petunia hybrida* Hort. I. Localization of Ca^{2+} ions in maturing pollen grain. *Folia Histochem. Cytobiol.* **32**: 265–269.
- [5] BEDNARSKA E., BUTOWT R. 1995. Calcium in pollen-pistil interaction in *Petunia hybrida* Hort. II. Localization of Ca^{2+} ions and Ca^{2+} -ATPase in unpollinated pistil. *Folia Histochem. Cytobiol.* **33**: 43–52.
- [6] BERRIDGE M. J. 1993. Inositol trisphosphates and cell signaling. *Nature* **361**: 315–325.
- [7] BREWBAKER J. L., KWACK B. H. 1963. The essential role of calcium ions in pollen germination and pollen tube growth. *American J. Bot.* **50**: 859–865.
- [8] BROWNLEE C. 1994. Signal transduction during fertilization in algae and vascular plants. *New Phytol.* **127**: 399–423.
- [9] BUSH D. S. 1995. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* **46**: 95–122.
- [10] BUTOWT R., RODRÍGUEZ-GARCIA M. I., ALCHÉ J. D., GÓRSKA-BRYLASS A. 1997. Calcium in electron-dense globoids during pollen grain maturation in *Chlorophytum elatum* R. Br. *Planta* **203**: 413–421.
- [11] CARPITA N. C., GIBEAUT D. M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* **3** (1): 1–30.
- [12] CARROLL J., SWANN K., WHITTINHAM D., WHITAKER M. 1994. Spatiotemporal dynamics of intracellular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations during the growth and meiotic maturation of mouse oocytes. *Development* **120**: 3507–3517.
- [13] CASE R. M., ANSAH T. A., DHO S., MIZINIAK A., WILSON L. 1988. Calcium homeostasis in exocrine secretory cells. W: Ch. GERDAY, L. BOLIS, R. GILLES (red.) Calcium and calcium binding proteins. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio, s. 211–219.
- [14] CHAPMAN G. P. 1987. The tapetum. *Int. Rev. Cytol.* **107**: 111–125.
- [15] CHAUBAL R., REGER B. J. 1990. Relatively high calcium is localized in synergid cells of wheat ovaries. *Sex. Plant Reprod.* **3**: 98–102.
- [16] CHAUBAL R., REGER B. J. 1992. Calcium in the synergids and other regions of pearl millet ovaries. *Sex. Plant Reprod.* **5**: 34–46.
- [17] CHAUBAL R., REGER B. J. 1992. The dynamics of calcium distribution in the synergid cells of wheat following pollination. *Sex. Plant Reprod.* **5**: 206–213.
- [18] CHAUBAL R., REGER B. J. 1993. Prepollination degeneration in mature synergids of pearl millet: an examination using antimonate fixation to localize calcium. *Sex. Plant Reprod.* **6**: 225–238.
- [19] CHAUBAL R., REGER B. J. 1994. Dynamics of antimonate-precipitated calcium and degeneration in unpollinated pearl millet synergids after maturity. *Sex. Plant Reprod.* **7**: 122–134.
- [20] CHUDZIK B., ŚNIEŻKO R. 1999. Histochemical features signaling receptivity of ovules of *Oenothera hookeri* de Vries and *Oe. mut. brevistilis*. *Acta Biol. Cracov. Series Botanica* **41**: 119–126.
- [21] FAURE J.-E., DIGONNET C., MÔL R., MATTHYS-ROCHON E., DUMAS C. 1994. In vitro pollination and fertilization in maize (*Zea mays* L.): technical procedures and prospects for the dissection of the double fertilization process. *Plant Sci.* **104**: 1–10.
- [22] FAURE J.-E., MOGENSEN H. L., DUMAS C. 1994. An in vitro system for adhesion and fusion of maize gametes. *Science* **263**: 1598–1600.
- [23] FAURE J.-E., ROUGIER A. M., DUMAS C. 1996. Emerging data on pollen tube growth and fertilization in flowering plants, 1990–1995. *Protoplasma* **193**: 132–143.
- [24] FRANKLIN-TONG V. E., DRĚBAK B., ALLAN A. C., WATKINS P. A. 1996. Growth of pollen tubes of *Papaver rhoeas* is regulated by a slow-moving calcium wave propagated by inositol 1,4,5-triphosphate. *Plant Cell* **8**: 1305–1321.
- [25] GLENK H. O., WAGNER W., SCHIMMER O. 1971. Can Ca^{++} ions act as a chemotropic factor in *Oenothera* fertilization? W: J. HESLOP-HARRISON (red.), Pollen: Development and Physiology. London Butterworths, s. 255–261.
- [26] GOLASZEWSKA B., BEDNARSKA E. 1997. Calcium metabolism in the maturing anther of *Allium cepa* L. *Acta Biol. Cracov. Series Botanica* **39**: 54.
- [27] GOLASZEWSKA B., BEDNARSKA E., NARBUTT O. 2000. Immunocytochemical localization of calmodulin in fertile and sterile anther of *Allium cepa* L. *Acta Biol. Cracov. Series Botanica* **42**(1).

- [28] GÓRSKA-BRYLASS A., WRÓBEL B., NARBUTT A. 1988. Extranucleolar extrusion of nucleolar material during diplotene in microsporocytes of *Larix decidua* Mill. W: M. CRESTI, P. GORI. (red.), Sexual Reproduction in Higher Plants, Berlin-Heidelberg, New York. s. 145–150.
- [29] GÓRSKA-BRYLASS A., BUTOWT R., RODRÍGUEZ-GARCIA M. I. 1997/1998. Distribution of loosely-bound calcium in the vegetative and generative cells of the pollen grain in *Chlorophytum elatum*. *Biol. Plantarum* **40**: 169–181.
- [30] HAUBER I., HERTH W., REISS H. D. 1984. Calmodulin in tip-growing plant cells, visualized by fluorescing calmodulin-binding phenothiazines. *Planta* **162**: 33–39.
- [31] HE C. P., YANG H. Y. 1992. Ultracytochemical localization of calcium in the embryo sac of sunflower. *Chin. J. Bot.* **4**: 99–106.
- [32] HEPLER P. K. 1994. The role of calcium in cell division. *Cell Calcium* **16**: 322–330.
- [33] HEPLER P. K., HOLDAWAY-CLARKE T. L., HACKETT G., LANCELE S. A. KUNKEL J. 1992. Exocytosis in pollen tubes: regulation by calcium. *J. Exp. Bot.* **48** (suppl.): 4.
- [34] HUANG B. Q., RUSSELL S. D. 1992. Synergid degeneration in *Nicotiana*: a quantitative, fluorochromatic and chlorotetracycline study. *Sex. Plant Reprod.* **5**: 151–155.
- [35] JAFFE L. A., WEINSENSEEL M. H., JAFFE L. F. 1975. Calcium accumulations within the growing tips of pollen tubes. *J. Cell Biol.* **67**: 488–492.
- [36] JOŃCZYK B., BEDNARSKA E. 1996. Subcellular Ca^{2+} localization in the tapetum male fertile and male sterile anther in *Allium cepa* L. *Folia Histochem. Cytobiol.* **34**: (suppl. 2): 80.
- [37] JOŃCZYK B., BEDNARSKA E., DORUCHOWSKI R. 1996. Ca^{2+} localization in the microspore stage of male fertile and male sterile anther in *Allium cepa*. *Acta Soc. Bot. Pol.* **65**: 189.
- [38] KIM G. H., FRITZ L. 1993. Gamete recognition during fertilization in a red alga, *Antithamnion nipponicum*. *Protoplasma* **174**: 69–73.
- [39] KOHNO T., SHIMMEN T. 1987. Ca^{2+} – induced fragmentation of actin filaments in pollen tubes. *Protoplasma* **141**: 177–179.
- [40] KRANZ E., LÖRZ H. 1994. In vitro fertilization of maize by single egg and sperm cell protoplast fusion mediated by high calcium and high pH. *Zygote* **2**: 125–128.
- [41] KRANZ E., VON WIEGEN P., LÖRZ H. 1995. Early cytological events after induction of cell division in egg cells and zygote development following in vitro fertilization with angiosperm gametes. *Plant J.* **8**: 9–23.
- [42] LENARTOWSKA M., BEDNARSKA E. 1997. Do pectins participate in the regulation of the postpollination elevation of calcium level in the transmitting tract of the style in *Petunia hybrida* Hort? *Acta Biol. Cracov. Series Botanica* **39**: 58.
- [43] LENARTOWSKA M., BEDNARSKA E., BUTOWT R. 1997. Ca^{2+} in the pistil of *Petunia hybrida* Hort. during growth of pollen tube – cytochemical and radiographic studies. *Acta Biol. Cracov. Series Botanica* **39**: 79–89.
- [44] LENARTOWSKA M., RODRÍGUEZ-GARCIA M. I., BEDNARSKA E. 1998. The part of pectins in the postpollination interaction of the male gametophyte with the somatic cells of pistil in *Petunia hybrida* Hort. XVth International Congress on Sexual Plant Reproduction. Wageningen, *Congress Materials* p. 91.
- [45] LENARTOWSKA M., RODRÍGUEZ-GARCIA M. I., BEDNARSKA E. 1998. Immunocytochemical localization of calmodulin in the unpollinated and pollinated style of *Petunia hybrida* Hort. XVth International Congress on Sexual Plant Reproduction. Wageningen, *Congress Materials* p. 90.
- [46] LEŚNIEWSKA J. 1996. Ciała Ubischa – produkt działalności tapetum. *Wiad. Bot.* **40**: 45–54.
- [47] LEŚNIEWSKA J., GRĄDZKA I., SZUMIEL I., CHARZYŃSKA M. 1997. PCD-related DNA degradation in the nuclei of anther tapetum identified by the comet assay. *Acta Biol. Cracov. Series Botanica* **39** (suppl. 1): 45.
- [48] LIU B., DU J. Z. 1989. Purification and some physicochemical properties of calmodulin in *Brassica campestris* pollen. *Acta Biochem. Biophys. Sin.* **21**: 477–483.
- [49] LONGO FJ. 1987. Fertilization. Chapman & Hall, London.
- [50] MAJEWSKA-SAWKA A., RODRÍGUEZ-GARCIA M. I., NAKASHIMA H., JASSEM B. 1993. Ultrastructural expression of cytoplasmic male sterility in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Sex. Plant Reprod.* **6**: 22–32.
- [51] MALHÓ R., READ N. D., PAIS M. S., TREWAVAS A. J. 1994. Role of cytosolic free calcium in the reorientation of pollen tube growth. *Plant J.* **5**: 331–341.
- [52] MALHÓ R., TREWAVAS A. J. 1996. Localized apical increased of cytosolic free calcium control pollen tube orientation. *Plant Cell* **8**: 1935–1949.
- [53] MASCARENHAS J. P., MACHLIS L. 1962. Chemotropic response of *Antirrhinum majus* pollen to calcium. *Nature* **196**: 292–293.
- [54] MASCARENHAS J. P. 1966. The distribution of ionic calcium in the tissues of the gynoeceum of *Antirrhinum majus*. *Protoplasma* **62**: 53–58.
- [55] MASCARENHAS J. P. 1993. Molecular mechanism of pollen tube growth and differentiation. *Plant Cell* **5**: 1303–1314.
- [56] MESSERLI M., ROBINSON K. R. 1997. Tip localized Ca^{2+} pulses are coincident with peak pulsatile growth in pollen tubes of *Lilium longiflorum*. *J. Cell Sci.* **110**: 1269–1278.
- [57] MILLER D. D., CALLAHAN D. A., GROSS D. J., HEPLER P. K. 1992. Free Ca^{2+} gradient in growing pollen tubes of *Lilium*. *J. Cell Sci.* **101**: 7–12.
- [58] MOUTINHO A., LOVE J., TREWAVAS A. J., MALHÓ R. 1998. Distribution of calmodulin protein and mRNA in growing pollen tubes. *Sex. Plant Reprod.* **11**: 131–139.
- [59] MURGIA M., CHARZYŃSKA M., ROUGIER M., CRESTI M. 1991. Secretory tapetum of *Brassica oleracea* L.: polarity and ultrastructural features. *Sex. Plant Reprod.* **4**: 28–35.
- [60] MUSGRAVE A., SCHURING F., MUNNIK T., VISSER K. 1993. Inositol 1,4,5-trisphosphate as fertilization signal in plants: test case *Chlamydomonas eugametos*. *Planta* **191**: 280–284.
- [61] PIERSON E. S., MILLER D. D., CALLAHAN D. A., SHIPLEY A. M., RIVERS B. A., CRESTI M., HEPLER P. K. 1994. Pollen tube growth is coupled to the extracellular

- calcium ion influx and the intracellular calcium gradient: Effect of BAPTA-type buffers and hypertonic media. *Plant Cell* **6**: 1815–1828.
- [62] PIERSON E. S., MILLER D. D., CALLAHAN D. A., VAN AKEN J., HACKETT G., HEPLER P. K. 1996. Tip-localized calcium entry fluctuates during pollen tube growth. *Develop. Biol.* **174**: 160–173.
- [63] RATHORE K. S., CORK R. J., ROBINSON K. R. 1991. A cytoplasmic gradient of Ca^{2+} is correlated with the growth of lily pollen tubes. *Develop. Biol.* **148**: 612–619.
- [64] REGER B. J., CHAUBAL R., PRESSEY R. 1992. Chemotropic responses by pearl millet pollen tubes. *Sex. Plant Reprod.* **5**: 47–56.
- [65] REISS H. D., HERTH W. 1978. Visualization of the Ca^{2+} -gradient in growing pollen tubes of *Lilium longiflorum* with chlorotetracycline fluorescence. *Protoplasma* **97**: 373–377.
- [66] REISS H. D., NOBILING R. 1986. Quin-2 fluorescence in lily pollen tubes: distribution of cytoplasmic calcium. *Protoplasma* **131**: 244–246.
- [67] ROSEN W. G. 1961. Studies on pollen tube chemotropism. *Am. J. Bot.* **48**: 889–895.
- [68] RUSSELL S. D. 1992. Double fertilization. *Inter. Rev. Cytol.* **140**: 357–388.
- [69] SCALI M., CAI G., CASINO C. D., SANTUCCI A., TIRLAPUR U. K., MOSCATELLI A., CRESTI M., TIEZZI A. 1994. Purification and biochemical characterization of calmodulin from *Corylus avellana* pollen. *Plant Physiol. Biochem.* **32**: 831–838.
- [70] TIRLAPUR U. K., VAN WENT J. L., CRESTI M. 1993. Visualization of membrane calcium and calmodulin in embryo sacs in situ and isolated from *Petunia hybrida* L. and *Nicotiana tabacum* L. *Ann. Bot.* **71**: 161–167.
- [71] TIAN H. Q., RUSSELL S. D. 1997. Calcium distribution in fertilized and unfertilized ovules and embryo sacs of *Nicotiana tabacum* L. *Planta* **202**: 93–105.
- [72] TIAN H. Q., RUSSELL S. D. 1998. The fusion of sperm cells and the function of male germ unit (MGU) of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Sex. Plant Reprod.* **11**: 171–176.
- [73] TIAN H. Q., KUANG A., MUSGRAVE M. E., RUSSEL S. D. 1998. Calcium distribution in fertile and sterile anthers of a photoperiod – sensitive gene male – sterile rice. *Planta* **204**: 183–192.
- [74] TIRLAPUR U. K., CRESTI M. 1992. Computer-assisted video image analysis of spatial variations in membrane associated Ca^{2+} and calmodulin during pollen hydration, germination and tip growth in *Nicotiana tabacum* L. *Ann. Bot.* **69**: 503–508.
- [75] TIRLAPUR U. K., SCALI M., MOSCATELLI A., DEL CASINO C., CAI G., TIEZZI A., CRESTI M. 1994. Confocal image analysis of spatial variations in immunocytochemically identified calmodulin during pollen hydration, germination and pollen tube tip growth in *Nicotiana tabacum* L. *Zygote* **2**: 63–68.
- [76] TIRLAPUR U. K., VAN WENT J. L., CRESTI M. 1993. Visualization of membrane calcium and calmodulin in embryo sacs in situ and isolated from *Petunia hybrida* L. and *Nicotiana tabacum* L. *Ann. Bot.* **71**: 161–167.
- [77] TIRLAPUR U. K., WILLEMSE M. T. M. 1992. Changes in calcium and calmodulin levels during microsporogenesis, pollen development and germination in *Gasteria verrucosa* (Mill.) H. Duval. *Sex. Plant Reprod.* **5**: 214–223.
- [78] TOMBES R. M., SIMERLY C., BORISY G. G., SCHATTEEN G. 1992. Meiosis. Egg activation, nuclear envelope breakdown are differentially reliant on Ca^{2+} whereas germinal vesicle breakdown is Ca^{2+} independent in the mouse oocyte. *J. Cell Biol.* **117**: 799–811.
- [79] TRETYN A. 1994. Wapń w komórkach eukariotycznych. PWN Warszawa.
- [80] TREVAWAS A. J., MALHÓ R. 1997. Signal perception and transduction: the origin of the phenotype. *Plant Cell* **9**: 1181–1195.
- [81] TRUMP B. F., BEREZESKY I. K. 1995. Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J.* **9**: 219–229.
- [82] WILLEMSE M. T. M. 1993. Calcium and calmodulin distribution in the tapetum. *Plant Syst. Evol.* [Suppl.] **7**: 107–116.
- [83] WILLIAMS C. M., ZHANG Z. M., MICHALAK M. I., CASS D. D. 1997. Calcium-induced protein phosphorylation and changes in levels of calmodulin and calreticulin in maize sperm cell. *Sex. Plant. Reprod.* **10**: 83–88.
- [84] XU HP, TSAO TH. 1997. Detection and immunolocalization of glycoproteins of the plasma membrane of maize sperm cells. *Protoplasma* **189**: 125–129.
- [85] YAN H., YANG H. Y., JENSEN W. A. 1991. Ultrastructure of the micropyle and its relationship to pollen tube growth and synergid degeneration in sunflower. *Sex. Plant Reprod.* **4**: 166–175.
- [86] ZHANG G., LIU D., CASS D. D. 1997. Calcium – induced sperm fusion in *Zea mays* L. *Sex. Plant Reprod.* **10**: 74–82.
- [87] ZHANG G., CASS D. D. 1997. Calcium signaling in sexual reproduction of flowering plants. *Recent Res. Devel. in Plant Physiol.* **1**: 75–83.
- [88] ZONIA L. E., TUPÝ J. 1995. Lithium treatment of *Nicotiana tabacum* microspores blocks polar nuclear migration, disrupts the partitioning of membrane – associated Ca^{2+} , and induces symmetrical mitosis. *Sex. Plant Reprod.* **8**: 152–160.
- [89] ŻYLIŃSKA L., REBAS E., ŁACHOWICZ A., ŁACHOWICZ L. 1998. Białka G – najważniejsze sygnalizatory komórkowe? *Post. Biochem.* **44**: 158–163.