ACTA AGROBOTANICA
Vol. XXVI, z. 2 — 1973

Rytmika przebiegu mikrosporogenezy u dzikiego gatunku ziemniaka *Solanum phureja* Juz. et Buk.

L. HAUSBRANDT i W. GOLINOWSKI

Instytut Biologii Roślin Akademii Rolniczej w Warszawie

L. Hausbrandt and W. Golinowski: (*Institute of Plant Biology, Agricultural Academy, Warsaw, Poland*) Acta Agrobotanica 26 (2): 285 - 302.

The rhythm in course of microsporogenesis in the wild species of potato — Solanum phureja Juz. et Buk.

The changes observed in tissues of the anther have been referred to the increasing sizes of the buds and the anthers. The enclosed table present the synchronization of several stages of development of such anther tissues as wall layers, tapetum and pollen mother cells.

WSTĘP

Dane dotyczące przebiegu mikrosporogenezy ziemniaka można znaleźć w opracowaniach ogólnych, np. u Maheswari (1950) lub Hayward (1938). Przypuszczać należy, że odnoszą się one do bliżej nie określonej w pracy, odmiany uprawnej. Dane dotyczące biologii kwitnienia i embriologii ziemniaka znajdujemy w pracach Berthaulta (1911), Bhaduri (1936), Chouduri (1943), Seuèges (1922). Nad cytologią ziemniaka pracował też Heyn (1931). Jeśli chodzi o gatunki dzikie, tj. nie będące w uprawie, lecz stanowiące materiał do prac hodowlanych, to w literaturze ostatnich dziesiątków lat, liczne prace cytogenetyczne zajmują się przede wszystkim określeniem i kontrolą liczby chromosomów oraz analizą mejozy dla badań nad powinowactwem między gatunkami.

24-chromosomowe gatunki ziemniaka są szczególnie interesujące jako zapylacze do krzyżówek z 48-chromosomowymi ziemniakami uprawnymi, dlatego znajomość przebiegu mikrosporogenezy i właściwości pyłku tych form ma praktyczne znaczenie.

Rytmiką przemian w czasie mikrosporogenezy zajmowali się Orel (1963), Nettancourt i Erickson (1967), prace te dotyczyły jednakże mikrosporogenezy u pomidora.

Celem naszej pracy było poznanie rytmiczności w procesie rozwoju pylnika i kształtowania się ziaren pyłku u dzikiego gatunku ziemniaka *Solanum phureja*. Miarę czasu określało w naszej pracy różnicowanie się kolejnych pączków w kwiatostanie, co jak wiadomo, jest wyrazem specyficznej rytmiki rozwoju stożka wzrostu w jego fazie generatywnej.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiałem naszych badań był 24-chromosomowy gatunek *Solanum phureja* Juz. et Buk. z kolekcji Instytutu Ziemniaka, prowadzony w szklarni w Młochowie. Kwitł on bardzo obficie. Pobieraliśmy z niego całe kwiatostany, z których badano wszystkie kolejne pączki aż do stadium rozwiniętego kwiatostanu. W wierzchołkowych kwiatostanach ziemniaka zakwitanie odbywa się w określonej kolejności, zakładaliśmy więc, że zbadanie wszystkich kolejnych pod względem wzrastających rozmiarów pączków da prawie ciągły obraz rozwoju pylnika i przebiegu mikrosporogenezy.

Część materiału była badana na świeżo, znaną i polecaną w różnych wariantach przez Matsubayashi (1963), metodą rozmazów acetokarminowych. W naszych badaniach pomijaliśmy dodawanie chlorku żelaza, jak zalecał Bains (1951), ponieważ nie wpływało to na jakość obrazu. Uzyskiwaliśmy dobre zabarwienie chromosomów, które wzmagało się po 24 godzinach, pozwalając obserwować metafazę, anafazę i telofazę. Po 48 godzinach można było obserwować nawet szczegóły profazy.

Z drugiej części materiału przygotowano serię preparatów trwałych utrwalanych w CRAF i FAA i barwionych safraniną i zielenią mocną, bądź metodą Foulgena, bądź metodą PAS, oraz lacmoidem.

Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu N.F.p.K. — Plan Zeissa i przystawki M. F. Zeissa.

PRZEBIEG MIKROSPOROGENEZY

U badanego gatunku, pylniki powstają w różnicującym się pączku jako 5 drobnych wypuklinek przybierających wcześnie kształt owalny. Poprzeczny przekrój pylnika już wówczas wykazuje 4 płaty odpowiadające formującym się czterem komorom. Od strony odosiowej pylnika wzrost jest silniejszy, tak że te dwie komory wyprzedzają w rozwoju komory od strony doosiowej. W łączniku przebiega drobna wiązka hadrocentryczna z nielicznymi elementami ksylemu otoczonymi warstewką floemu. Dookoła wiązki występuje miękisz.

Komory wypełnione są początkowo całkowicie niezróżnicowaną tkan-

ką merystematyczną. Komórki są cztero-, pięcio- i sześciokątne, ściśle przylegające, z dużymi jądrami i silnie barwiącymi się jąderkami.

Pierwsze zróżnicowanie polega na wyodrębnianiu się warstwy epidermalnej, która odcina się wyraźnie od masy komórek wypełniających przyszłą komorę. Wyodrębnianie zaczyna się od komór położonych odosiowo. Komórki epidermy nie różnią się jeszcze wówczas wielkością ani wyglądem od innych komórek. Różnica odnosi się do kierunku podziałów, które w epidermie są wyłącznie antyklinalne, na skutek czego pozostaje ona tkanką jednowarstwową.

Pod epidermą różnicuje się wówczas, przeważnie dwuwarstwowy, pokład komórek archesperialnych (Tabl. I). Są one 4- i 5-kątne i charakteryzują się wyraźnie wybarwionymi jądrami. W warstwie leżącej bezpośrednio pod epidermą (w tzw. pierwotnej warstwie ściennej) zachodzi kilka podziałów peryklinalnych. Prowadzą one do wytworzenia 2 - 5 warstw ściennych. Komórki warstw ściennych są dłuższe od komórek epidermy, ale raczej spłaszczone. W drugiej warstwie (w tzw. pierwotnej warstwie sporogenicznej) zachodzą także podziały peryklinalne. Jednakże w czasie różnicowania się warstw ściennych tempo podziału komórek sporogenicznych jest słabsze, tak że często napotkać można utrzymujący się przez pewien czas dwuwarstwowy pokład komórek sporogenicznych (Tabl. IIA). W końcu jednak podziały przybierają na intensywności i odbywają się we wszystkich kierunkach z pewną tylko przewagą podziałów peryklinalnych. Prowadzi to do wytworzenia pokładu komórek macierzystych pyłku.

Pokład komórek macierzystych pyłku osiąga grubość 4 do 5 komórek. Rozciąga się on na całą długość pylnika, a na przekroju poprzecznym ma charakterystyczny kształt podkowy. Komórki są pięcio- i sześciokątne, silnie wybarwiające się, o dużych wyraźnie wyróżniających się jądrach. Otoczone są grubą ścianą, której głównym składnikiem są początkowo pektyny.

Pokład komórek macierzystych pyłku odcina się ostro swym wyglądem od pozostałych komórek wypełniających komorę pyłkową. Te ostatnie mają charakter miękiszu, są mniej więcej równomierne i z racji swego położenia tworzą występy przegrody oddzielającej dwie komory (tj. odosiową i doosiową). Występy te określane są jako placentoidy i uważane za homologiczne z łożyskiem owocolistków (E a m e s 1961).

Równocześnie z wyróżnicowaniem się pokładu komórek macierzystych pyłku, widoczne stają się wyraźne zmiany zachodzące w komórkach bezpośrednio graniczących z tym pokładem. Z jednej strony są to komórki najgłębiej leżącej warstwy ściennej, z drugiej komórki zewnętrznej warstwy placentoidu. Zmiany te prowadzą do wytworzenia warstwy tapetowej, otaczającej pokład komórek macierzystych pyłku. Zachodzące w tej warstwie zmiany są bardzo znamienne. Początkowo są

to komórki pełne gęstej cytoplazmy. Przy tym można zauważyć różnice między tapetum wewnętrznym, powstałym na placentoidzie a tapetum zewnętrznym. Tapetum wewnętrzne wyprzedza nieco w rozwoju tapetum zewnętrzne, co jest tym bardziej zaakcentowane, że komórki w tej warstwie są znacznie większe. Różnice wiążą się wyraźnie z usytuowaniem tych dwóch części tapetum. Tapetum zewnętrzne znajduje się pod naporem rozrastającego się, na skutek podziałów komórek, pokładu sporogenicznego. Komórki w tej części są więc rozciągane stycznie do obwodu komory. Można też obserwować w tej warstwie antyklinalne podziały komórek zwiększające jej obwód. W tapetum wewnętrznym, komórki rozrastają się silnie zwłaszcza w kierunku prostopadłym do obwodu komory; to przede wszystkim wyróżnia je od pozostałych komórek wypełniających jeszcze całkowicie w tym czasie centralną część komory (Tabl. III). (Przykładowo podane wymiary obrazują różnice wielkości komórek w tych częściach tapetum — w zewnętrznym 5 - 6 μ, w wewnętrznym do 18 μ. Inne komórki w środkowej części komory nie przekraczają 8 μ).

Inne zmiany zachodzące w różnicującej się warstwie tapetowej są te same w części zewnętrznej, co i w wewnętrznej. Przede wszystkim zachodzą w nich jeden lub dwa podziały jądra. W rezultacie można obserwować komórki tapetowe dwu-, trój- i czterojądrowe. Charakterystycznym przejawem jest silna wakuolizacja, prowadząca ostatecznie do wytworzenia się w każdej komórce tapetowej dużej wakuoli zajmującej co najmniej 2/3 jej objętości. Wakuole te leżą od strony pokładu komórek macierzystych zarówno w wewnętrznym jak i zewnętrznym tapetum.

Równocześnie z tymi przemianami w komórkach tapetum, w macierzystych komórkach pyłku rozpoczyna się mejoza. Ma ona tu charakter mejozy równoczesnej. Pierwszy podział jest heterotypowy. Opisane przeobrażenia w tapetum zachodzą w czasie I profazy w komórkach macierzystych (Tabl. IIB). W tym samym czasie pojawia się dokoła komórek macierzystych pierwszy pokład kallozowy, a same komórki przybierają kształt zaokrąglony (Tabl. IVA). Proces odkładania kallozy ulega pewnemu zahamowaniu w czasie dalszych stadiów pierwszego podziału, w każdym razie nie obserwuje się dalszego grubienia otoczki kallozowej. Odkładanie kallozy wznowione zostaje przy zapoczątkowaniu lub nieco przed rozpoczęciem podziału homotypowego, który przebiega równocześnie w obydwu jądrach powstałych w podziale I.

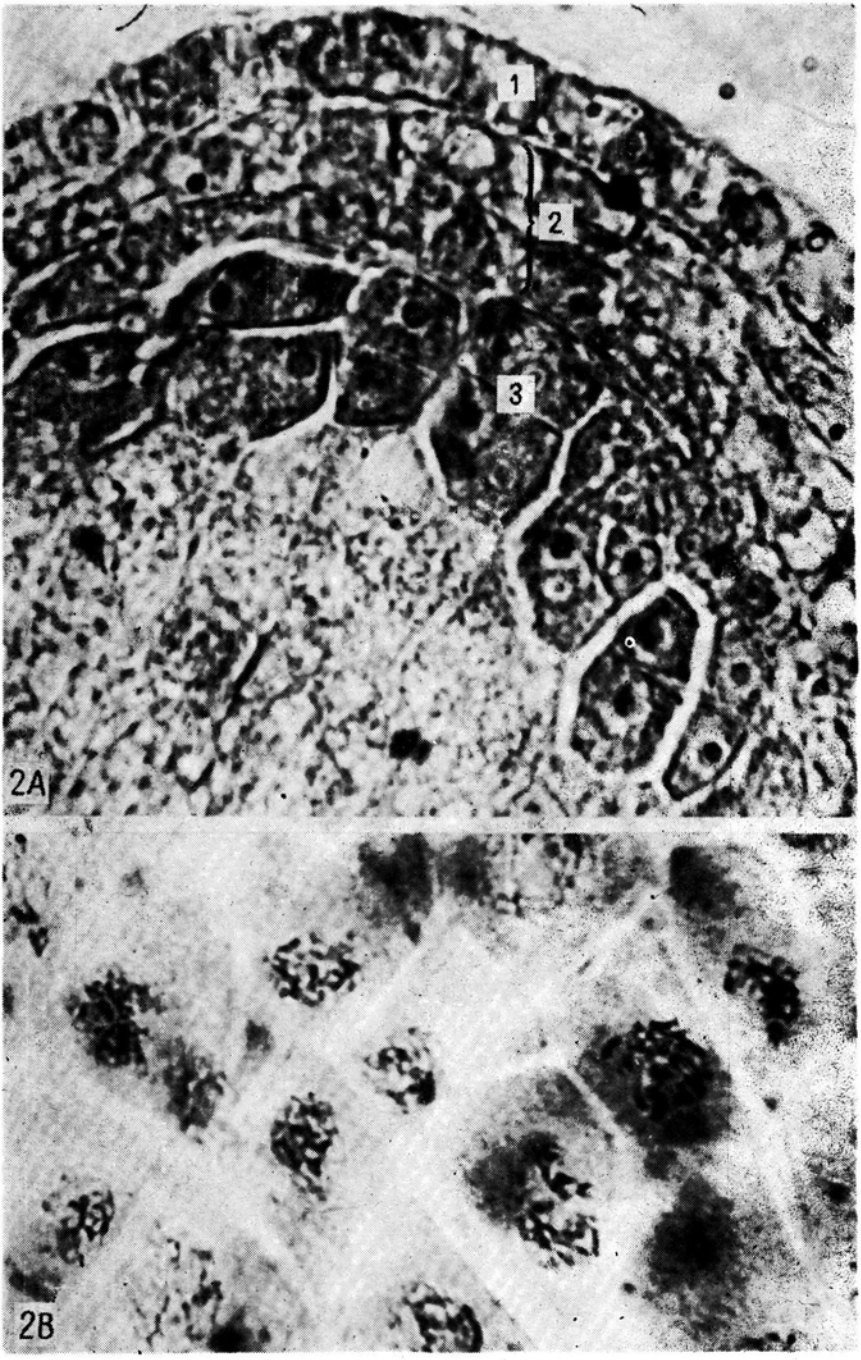
W trakcie podziału homotypowego, komórki tapetowe osiągają olbrzymie rozmiary. Długość ich sięgać może ponad 40 μ. W charakterystyczny sposób zmienia się położenie wakuoli. Zajmuje ona teraz przeszło 3/4 objętości komórki i zalega od strony placentoidu w tapetum wewnętrznym, a od strony warstw ściennych w tapetum zewnętrznym

Tablica I — Plate I

Poprzeczny przekrój komory pyłkowej
1 — epiderma, 2 — pierwotna warstwa ścienna, 3 — pierwotna warstwa sporogeniczna; (ok. 3200 ×)

A cross-section of an anther chamber
1 — epidermis, 2 — primary wall layer, 3 — sporogenous layer (ca × 3200)

Tablica II — Plate II



A — Wycinek z poprzecznego przekroju komory pyłkowej; B — Profaza podziału heterotypowego w komórkach macierzystych pyłku

1 — epiderma, *2* — warstwy ścienne, *3* — pokład komórek sporogenicznych; (ok. 3200 ×)

A — A fragment of cross-section of an anther chamber; B — Prophase I in pollen mother cells

1 — epidermis, *2* — differentiated wall layers, *3* — dividing sporogenous cells (× 3200)

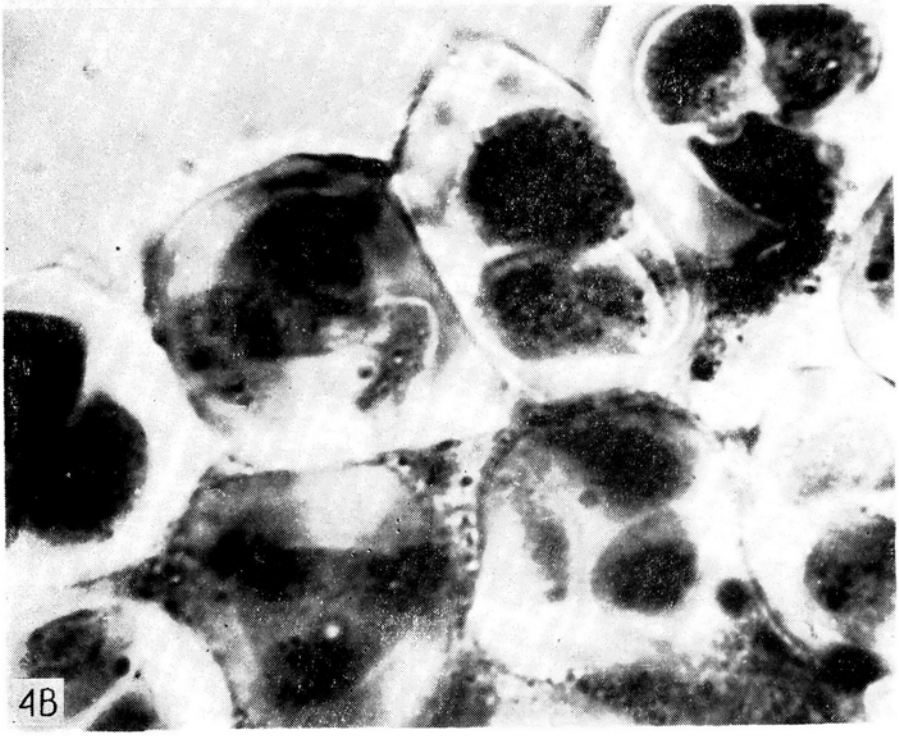
Tablica III — Plate III

Wycinek z poprzecznego przekroju komory pyłkowej

1 — epiderma, *2* — warstwy ścienne, *3* — zewnętrzne tapetum, *4* — pokład komórek macierzystych pyłku, *5* — wewnętrzne tapetum, *6* — komórki placentoidu (ok. 3200 ×)

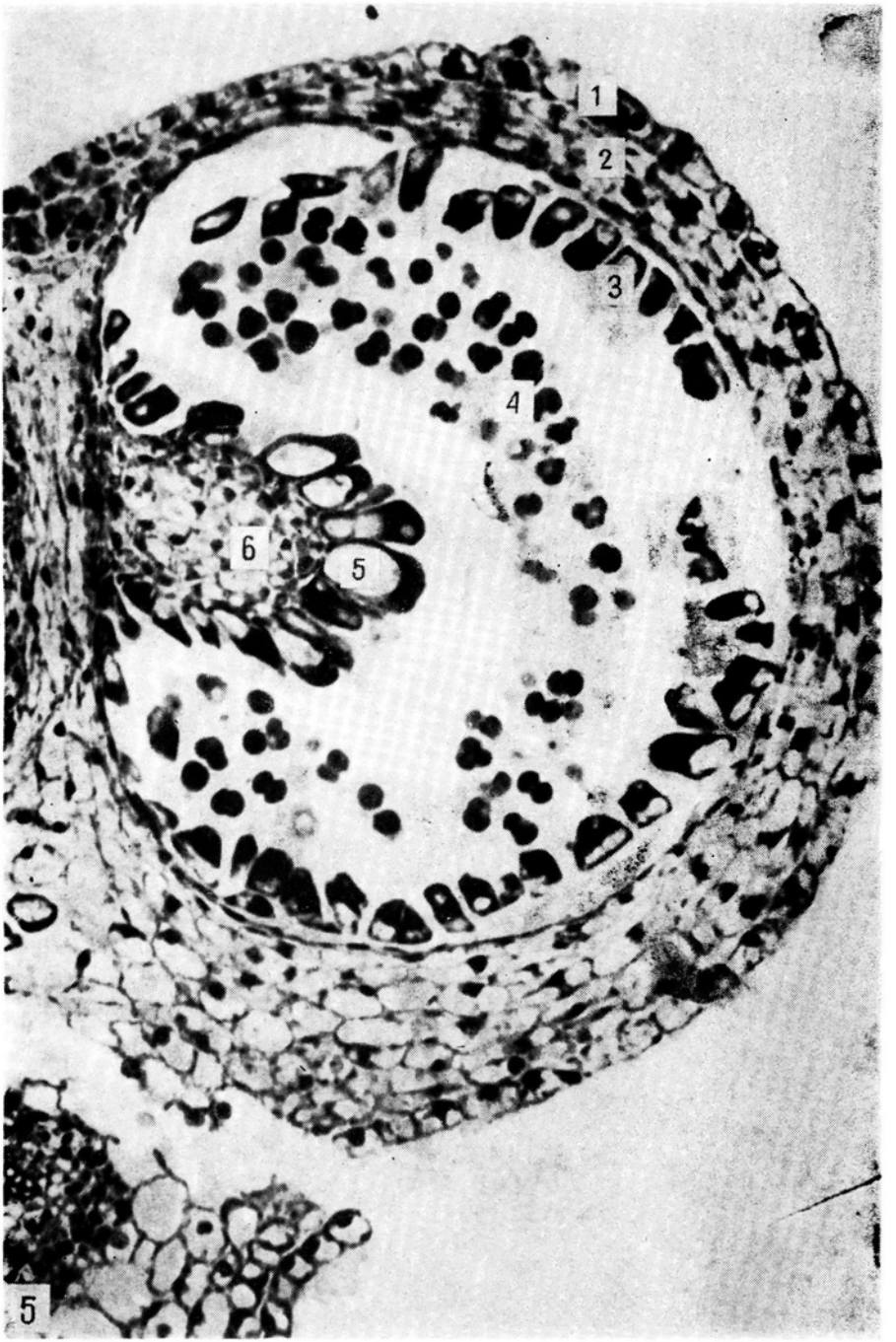
A fragment of a cross-section of an anther chamber

1 — epidermis, *2* — wall layers, *3* — outer tapetal cells, *4* — pollen mother cells, *5* — inner tapetal cells, *6* — cells of the placentoid (× 3200)



A — Metafaza podziału heterotypowego w komórkach macierzystych pyłku (ok. 3200 ×); B — Tetrady (ok. 3200 ×)

A — Metaphase I in pollen mother cells (× 3200); B — Tetrads (× 3200)



Poprzeczny przekrój komory pyłkowej w stadium tworzenia się tetrad
1 — epiderma, *2* — spłaszczone komórki warstw ściennych, *3* — warstwa tapetum zewnętrznego, *4* — tetrady w otoczkach kallozowych, *5* — komórki tapetum wewnętrznego, *6* — zanikający placentoid (300 ×)

A cross-section of an anther chamber in the stage of tetrads formation
1 — epidermis, *2* — flattened cells of wall layers, *3* — outer tapetal cells, *4* — tetrads in callose sheaths, *5* — inner layer of giant tapetal cells, *6* — disappearing placenoid (× 300)

(Tabl. V). Jest to okres najintensywniejszego wydzielania przez komórki tapetowe, w komorze pojawiają się wtedy masy substancji piankowatej. Ściśle przylegające do siebie uprzednio komórki zewnętrznej warstwy tapetowej ulegają rozsunięciu. Pozostaje to z pewnością w związku z powiększeniem się objętości komory w tym czasie. Średnica jej wzrasta prawie o 1/4 poprzedniego wymiaru. Na skutek tego komora przestaje być wypełniona, zwłaszcza że placentoidy ulegają kurczeniu się, gdyż komórki, z których są zbudowane, ulegają stopniowej resorpcji.

Po zakończeniu telofazy II dokoła tetrady powstaje nowy wspólny pokład kallozy, otoczka tetrady staje się bardzo gruba (Tabl. IVB). Dokoła każdej mikrospory tworzy się indywidualna otoczka izolująca od siebie nowo powstałe mikrospory.

Dalsze zmiany obserwowane w komórkach tapetowych polegają na coraz większym ich rozciąganiu, wakuola ciągle powiększa się, treść zostaje zepchnięta do ściany, jądra degenerują, po czym komórki te ulegają stopniowemu rozpadowi, tak że w końcu pozostaje z nich tylko cienka śluzowata warstewka wyściełająca od wewnątrz ścianę komory pyłkowej.

Jeszcze w otoczce kallozowej, na mikrosporach zaczyna formować się sporoderma. Mikrospory wtedy rosną i przybierają kształt kulisty. Kallozowa otoczka stopniowo ulega rozpuszczeniu i mikrospory uwalniają się, na powierzchni ich odkłada się egzyna o trzech szczelinowatych porusach. W końcu różnicuje się celulozowa pektynowa intyna i wtedy w komórkach pyłku zachodzi mitoza, poprzedzona wakuolizacją treści. Wakuole są duże — jedna lub dwie. Po wytworzeniu komórki generatywnej, ziarna pyłku osiągają 24 μ średnicy i leżą swobodnie w komorze pyłkowej. Zaraz po mitozie obserwuje się w nich drobną wakuolizację i nagromadzenie się ziaren skrobi. W okresie dojrzewania pylnika skrobia stopniowo zanika, a po otwarciu kwiatu ulega całkowitej hydrolizie.

SYNCHRONIZACJA ROZWOJU TKANEK W MIKROSPOROGENEZIE

Zbadano przebieg mikrosporogenezy w 20 kwiatostanach o różnej liczbie pączków (od 3 do 11), odnosząc obserwowane różnicowanie się tkanek do długości pączka i długości pylnika. Odchylenia pomiarów były niewielkie. Przykładowo podajemy w tabeli 1 dane odnoszące się do najliczniejszego z przebadanych kwiatostanów.

Zestawienie w tabeli 1 danych uzyskanych z naszych obserwacji wykazuje, że określone zmiany zachodzące w rozwijających się tkankach pylnika pojawiają się w pylnikach o określonych i zawsze tych samych wymiarach wzrastających zgodnie z rozmiarami pączka.

Poza tym, jakkolwiek rozwój poszczególnych tkanek odbywa się

Tabela 1 — Table 1

Synchronizacja rozwoju tkanek w mikrosporogenezie u *Solanum phureja*

Synchronism in tissue development during microsporogenesis in *Solanum phureja*

Nr pączka No. of bud	Długość pączka w mm Bud length in mm	Długość pylnika w mm Anther length in mm	Archespor Archesporium	Warstwy ścienne Wall layers	Tapetum Tapetum	Mikrospory Microspores
1	1	Różnicowanie się pylnika Differentiation of the anther	Komory wypełnione nie zróżnicowaną tkanką merystematyczną Chambers filled with an undifferentiated meristematic tissue			
2	1,5	0,5	Różnicowanie się warstw archesporu. Podziały peryklinalne Differentiation of archesporial layers. Periclinal divisions	Wyodrębnianie się epidermy i pierwotnej warstwy ściennej Differentiation of the epidermis and the primary wall layer		Wyodrębnianie się pierwotnej warstwy sporogenicznej Differentiation of the primary sporogenous layer
3	2	1		Wytworzenie się 2 - 5 warstw ściennych Development of 2 - 5 wall layers	Różnicowanie się tapetum wewnętrznego i zewnętrz. Differentiation of the inner and outer tapetum	Różnicowanie się 2 - 5 warstw komórek macierzystych pyłku Differentiation of 2 - 5 layers of pollen mother cells
4	2,5	1,5		Rozrastanie się komórek epidermy i warstw ściennych Increasing of epidermal cells and wall layers	Silne rozrastanie się komórek tapetum wewnętrznego. Wakuolizacja. Podziały jądra Increasing of inner tapetal cells and their vacuolisation. Division of nucleous	Heterotypowy podział mejotyczny w komórkach macierzystych pyłku. Pojawienie się otoczki kallozowej. Heterotypic division in pollen mother cells. Forming of callose sheath
5	3	2			Komórki tapetum wewnętrznego osiągają maksymalne wymiary. Intensywne wydzielanie Inner tapetal cells reach their maximum size. Intense excretion	Podział homotypowy. Grubienie otoczki kallozowej Homotypic division. Thickering of callose sheath

6	3,5	2,5		Hypertrofia komórek skórki. Rozciągnięcie i spłaszczenie warstw ściennych. Degeneracja komórek placentoidu Hypertrofy of epidermal cells. Flattening of wall layers. Degeneration of cells in placentoid	Rozluźnienie komórek tapetowych. Intensywne wydzielanie Loosening of tapetal layer. Intense excretion	Tetrady w grubej otoczce kallozowej Tetrads in thick callose sheath
7	4	3			Rozsuwanie się komórek tapetum zewnętrznego. Przemieszczanie się wakuoli Pushing cells of innêr tapetum apart. Displacement of vacuole	Uwalnianie się mikrospor z otoczki kallozowej Releasing of microspores from callose sheath
8	6,5	4			Rozpad komórek tapetum Collapsing of tapetal cells	Wakuolizacja i mitoza w mikrosporach Vacuolisation and mitosis in microspores
9	7	5			Ostateczne ześluzowacenie komórek tapetum Sliming and desintegration of tapetal cells	Powiększenie się ziaren pyłku Increasing of pollen grains
10	8	5		Przerwanie przegrody i połączenie komór Breaking of septum and connection of chambers		Tworzenie się egzyny na ziarnach pyłku Forming of exine on pollen grains
11	9	6		Gromadzenie się skrobi w epidermie i miękiszu okołozwiązkowego Accumulation of starch in epidermis and in parenchyma of the connective		Drobna wakuolizacja w ziarnach pyłku i gromadzenie się skrobi. Tworzenie się intyny Fine vacuolisation and starch accumulation in pollen grains. Forming of intine
12	Kwiat otwarty The flower opened	8		Śluzowacenie komórek ściennych w miejscach otwarcia pylnika oraz komórek placentoidu. Zanik skrobi Sliming of wall cells in the place of anther opening and cells of placentoid. Starch disappearing		Hydroliza skrobi w ziarnach pyłku Starch hydrolysis

według właściwej dla każdej z nich rytmiki, istnieje ścisła synchronizacja tych zjawisk w trakcie mikrosporogenezy, prowadząca do wytworzenia i uwolnienia dojrzałych, zdolnych do kiełkowania ziaren pyłku.

Autorzy dziękują p. doc. dr. hab. Kazimierzowi Świerzyńskiemu i p. mgr Ewie Sawickiej za umożliwienie przeprowadzenia części badań na terenie Instytutu Ziemniaka i udostępnienie materiałów.

(Wpłynęło dn. 28.XI.1972 r.)

SUMMARY

All buds and an opened flower of a cymose of the wild diploid species of potato — *Solanum phureja* Juz. et Buk. have been fixed and investigated with common cytological methods.

As the differentiation of successive buds in the inflorescence reflects the rhythm in development of a stem apex in its generative phase so an almost continuous picture of the development of the anther and the course of microsporogenesis has been obtained.

The changes observed in tissues of the anther have been referred to the increasing sizes of the buds and the anthers.

The table enclosed is showing the synchronism of several stages of development of such anther tissues as wall layers, tapetum and pollen mother cells.

LITERATURA

Bains G. S. 1951, Cytogenetical studies in the genus *Solanum*, M. S. Univ. Cambridge.

Berthault P., 1911, Recherches botaniques sur les varietés cultivées du *Solanum tuberosum* et les espèces sauvages de *Solanum* tubiferes voisins, Ann. Sci. Agron. 28: 1 - 59, 87 - 143, 173 - 216, 248 - 291.

Bhaduri P. N., 1936, Studies on the embryogeny of the *Solanaceae*, Bot. Gaz. 98: 283 - 295.

Chouduri H. C., 1943, Cytological studies in the genus *Solanum*. I. Wild and native cultivated diploid potatoes, Trans. Roy. Soc. Edinb. 61: 113.

Cooper D. C., 1933, Nuclear divisions in the tapetall cells of certain angiosperms, Am. Jour. Bot. 20: 358 - 364.

Eames A. J., 1961, Morphology of the Angiospens.

Hayward H. E., 1938. The Structure of Economic Plants.

Heyn H., 1931. Beitrage zur Cytologie der Kartoffel, Wiss. Archiv. Landwirt. 4: 128 - 168.

Maheswari P., 1950, An Introduction to the Embryology.

Matsubayashi M., 1963, Prolonged direct staining of acetocarmine squashes of *Solanum* microsporocytes, Stain Techn. 38, N. 1.

Nettancourt D., Erickson G., 1967, Effects of irradiation upon starch formation and starch hydrolysis in tomato microspores, Hereditas 60: 168 - 176.

Orel L. J., 1963, Formation of sterile pollen in tomatoes, Biol. Sci. Sect. 147: 1418 - 1420.

Ramanna M. S., Prakken R., 1967, Structure of an homology between pachyten and somatic metaphase chromosomes of the tomato, Genetica 38: 115 - 132.

Sauèges R., 1922, Recherches sur l'embryogénie des Solanacées, Bull. Soc. Bot. France 69: 555 - 585.