Rozwój i budowa pyłku oraz liczba chromosomów u *Bosea cypria* Boiss (Amaranthaceae)

*Chromosome number and pollen grain development
in *Bosea cypria* Boiss (Amaranthaceae)*

M. ZENKTELER

I. WSTĘP

Bosea cypria Boiss. według podziału systematycznego Englera (1934) należy do rodziny *Amaranthaceae*. Jest to jeden z bardzo ciekawych endemicznych gatunków flory Cypru. Poza tym gatunkiem występują jeszcze na świecie tylko dwa z tego rodzaju: w Himalajach *Bosea amherstiana* (Wall.) Hook oraz na Wyspach Kanaryjskich — *Bosea yervamora*. Engler podaje, iż na ogólną ilość poznanych 64 rodzajów rodziny *Amaranthaceae* występuje: 28 rodzajów bylin, krzewinek, półkrzewów lub krzewów; 10 rodzajów krzewów i 2 rodzaje krzewów lub form drzewiastych. *Bosea cypria* jest małym krzakiem o grubych zimotrwałych liściach i wchodzi tu na Cyprze w skład makii. Okwiat złożony jest z 5 łusieczkowatych wolnych działek oraz 5 podobnych płatków. W kwiecie występuje 5 pręcików, 1 — jednokomorowy słupek o dwóch znamionach. Interesujący jest sposób otwierania się okwiatu: gdy pylniki są dojrzałe, to pod wpływem ogrzania przez promienie słoneczne następuje szybkie rozchylenie się listków okwiatu. Odbywa się to zwykle z rana pod wpływem pierwszych promieni słonecznych. Potem następuje szybki wzrost nitek pręcikowych i pręciki wkrótce zaczynają pylić. Kwiat przekwita i zamyka się tego samego dnia lub po 36 godzinach. Listki okwiatu stulają się, tak iż okwiat pokrojem swym przypomina pączek, z tą różnicą tylko, że nad szczytem okwiatu pozostają zasychające pręciki. U *Amaranthaceae* zapylenie następuje przez wiatr, a *Bosea cypria* mimo niepozornego okwiatu i braku zapachu zapyłana jest przez owady. Owocem są czerwone jagody poszukiwane przez owady.

Embriologiczne badania różnych przedstawicieli rodziny *Amaranthaceae* przeprowadzili K a j a l e (1937 r. 1940) i J o s h i (1937). Brak jednak

wszelkich bliższych badań embriologicznych rodzaju *Bosea*, z wyjątkiem krótkiej wzmianki podanej przez K a j a l e (1940), a dotyczącej budowy załączka u *Bosea amherstiana*. Nawet to doniesienie jest niepełne i fragmentaryczne ze względu na nie wystarczającą ilość materiału do badań posiadanego przez autora.

Celem niniejszej pracy jest prześledzenie powstawania i budowy pyłków oraz stwierdzenie ilości chromosomów.

Podane opisy dotyczące morfologii rośliny i jej zakwitania oraz występowanie *Bosea* w oddzielnych, rozrzuconych centrach geograficznych zaczerpnąłem z pracy S. K r u p k o (1942) oraz z jego ustnych relacji. Materiał w postaci pąków o różnych stadiach rozwojowych został zebrany i utrwalony na Cyprze przez prof. S. K r u p k o w 1941 r. i służył do niniejszej pracy..

II. TECHNIKA I METODY PRACY

Pąki utrwalone w płynie Nawaszina i zatopione w parafinie krojono podłużnie i poprzecznie na mikrotomie na skrawki grubości 10 μ . Używano następujących metod barwienia:

1. Metoda Feulgena (hydrolizowanie przez 10 min w 1 n HCl o temp. 60°C. Przed i po włożeniu skrawków do gorącego kwasu trzymano preparaty przez 2 min w zimnym 1 n HCl).

2. Metoda Feulgena z dobarwianiem zielenią jasną.

3. Fiolet krystaliczny z dobarwianiem oranżem G w olejku goździkowym.

Celem stwierdzenia substancji zapasowych w pyłkach stosowano następujące metody:

1. Na tłuszcze: Sudan III, Sudan czarny, kwas osmowy 1 i 2^o.

2. Na skrobię: JKJ.

3. Na białka: reakcja biuretowa, ksantoproteinowa, Millona.

Obserwacje, rysunki i fotografie robiono przy pomocy mikroskopu Reicherta—Neozet z kondensorem Polyphos i z obiektywami fazowymi, oraz na tymże mikroskopie z kondensorem normalnym i obiektywem imersyjnym fluorytowym.

III. OBSERWACJE

Rozwój ziaren pyłku: Pylniki są dość duże, każdy składa się z dwóch worków, w których występują dwie komory. Komórki archesporialne różnicują się pod epidermą. Komórek tych jest kilkanaście i nie występują w szeregach. Ściana pylnika jest 4- lub 5-warstwowa (fot. 1). Zgrubienia poprzeczne w endotecjum pojawiają się wtedy, gdy pyłki są

2-jądrowe (fot. 9). Dwie warstwy komórek przejściowego pokładu widoczne są w niektórych pylnikach, ale tylko w okresie wczesnego ich rozwoju. Warstwy te zanikają dość wcześnie.

Ostatnia warstwa wewnętrzna granicząca z komórkami macierzystymi staje się warstwą tapetową. Komórki tapetum są początkowo 1-jądrowe; podczas I podziału meiotycznego stają się 2-jądrowe drogą normalnej mitozy bez występowania cytokinezy. Ilość jąder jest duża. Z początku w komórkach 1-jądrowych jąder jest od 1 do 2; w tapetum 2-jądrowym spotyka się do 8 jąder. W żadnym preparacie nie spotkano tapetum 2-warstwowego. Komórki tapetum trwają nie naruszone, aż do czasu cytokinezy komórek macierzystych pyłku; od tego momentu zaczynają się one kurczyć. Przy zanikaniu tapetum kurczące i malejące jądra wybarwiają się bardzo intensywnie metodą Feulgena. Zabarwienie jest znacznie silniejsze od zabarwienia jąder w pozostałych tkankach (fot. 10). Tapetum jest typu sekrecyjnego. Komórki archesporialne dzielą się mitotycznie na komórki macierzyste pyłków. W mejozie zaobserwowano poszczególne stadia podziałowe z wyjątkiem wyraźnego pachetynu. Nici

Ryc. 1. Diakineza (reakcja Feulgena). 2670 $\times$ — Diakinensis (Feulgen's react.). 2670 $\times$

Ryc. 2. Metafaza I podziału meiotycznego (reakcja Feulgena). 2250 $\times$
The I meiotic metaphase (Feulgen's react.). 2250 $\times$

leptotenowe w większości preparatów są bardzo skurczone i zbite. Niektóre jednak pylniki po zastosowaniu metody Feulgena dawały obrazy ładnie rozłożonych chromonem (fot. 2, 3a, 3b, 4). Liczne stadia diakinez służyły do rysowania i rachowania biwalentów (fot. 5, rys. 1). Porachowano biwalenty na 50 przykładach i na tej podstawie ustalono ich ilość na 13. Spotykano też liczby 14 i 15 (ok. 5%), które uważamy jako zakłócenia meiotyczne, prawdopodobnie zależne od powstawania pewnej ilości monowalentów. Płytki metafazalne I podziału (rys. 2, fot. 6) złożone są z biwalentów grubych i na ogół krótkich, w ilości 13.

Powstawanie tetrad jest typu równoczesnego; pyłki ułożone są głównie tetrahedralnie, ale zdarza się też układ izobilateralny (fot. 7, 8). W młodych pyłkach jądro leży w środku komórki. Wkrótce zwiększa się ilość cytoplazmy, wykształca się błona i w ziarnie pojawiają się wakuole. W pyłkach jednojądrowych jądro jest duże i przybiera często postać soczewki (fot. 11). W pyłkach 2-jądrowych jądro komórki generatywnej jest mniejsze i barwi się znacznie silniej po zastosowaniu reakcji Feulgena od jądra komórki wegetatywnej. Reakcja Feulgena z podbarwianiem zielenią jasną pozwala wyróżnić w pyłku komórkę generatywną; gęstsza warstwa na zielono wybarwionej cytoplazmy przylega do jądra generatywnego (fot. 14, rys. 3). Kiedy jądro generatywne podzieli się na dwa jądra plemnikowe, wakuoli już nie widać i ziarno pyłku jest całkowicie wypełnione cytoplazmą. Powstałe jądra plemnikowe barwią się intensywnie metodą Feulgena; jądro wegetatywne tą metodą nie barwi się wcale lub słabo (fot. 12, 15a, 15b. Fotografia 12 zrobiona jest przy pomocy kontrastu fazowego; dlatego jądro wegetatywne kształtu zakrzywionego ciała wydaje się podobnie silnie wybarwione jak jądro plemnikowe). W ją-

Ryc. 3. Pyłek 2-komórkowy: komórka generatywna i wegetatywna (reakcja Feulgena, zielenią jasną). 1900 $\times$ — Pollen grain: a generative nucleus and cell, the tube nucleus (Feulgen's react., light green). 1900 $\times$

Ryc. 4. Metafaza mitotyczna, (fiolet krystaliczny). 2250 $\times$ — The chromosomes of mitotic metaphase (crystal violet). 2250 $\times$

drach plemnikowych zaobserwowano jąderka. Egzyna i intyna wykształcają się wcześniej i są już obecnie w pyłkach 1-jądrowych. Egzyna jest grubsza od intyny i należy do typu „psilate“. Stwierdzono występowanie 10 por.

Wszelkie próby wykrycia ciał zapasowych w pyłkach nie dały żadnych rezultatów. Przeciętna średnica pyłków wynosi 18 μ .

Nie zaobserwowano na żadnym preparacie pyłków leżących na znamionach słupka i wytwarzających łagiewki.

Liczba chromosomów: Celem ustalenia liczby chromosomów

badano podziały mejotyczne komórek macierzystych pyłków i mitozy występujące w komórkach archesporialnych, w epidermie pylnika, oraz w komórkach tapetum 2-jądrowego. Na podstawie podziałów mejotycznych ustalono liczby biwalentów na 13 (rys. 2, fot. 6). W płytkach metafazalnych mitozy stwierdzono 26 chromosomów (rys. 4). W komórkach tapetum 2-jądrowego zaobserwowano niekiedy podział jąder i wówczas ilość chromosomów w metafazie wynosiła około 52. Wskazywałoby to na prawdopodobieństwo występowania w tapetum tetraploidalnych jąder. W badanym materiale dużą trudność stanowiło odróżnienie poszczególnych chromosomów metafazalnych w mitozie ze względu na ich silne zbiecie i przeplatanie się. Dlatego też nie zdołano morfologicznie opisać chromosomów i uszeregować ich w idiogramy.

Uwagi dotyczące budowy zalążków

W jednokomorowym słupku wykształca się jeden zalążek anatropowy. Występują dwa integumenty, z których wewnętrzny tworzy mikropyle. Tkanka nucellusa jest dobrze wykształcona. Na zbadanych licznych słupkach w różnych stadiach rozwojowych — od bardzo wczesnych do słupków z pąków przekwitłych — nie stwierdzono powstawania woreczka zalążkowego. Nie zaobserwowano również wykształcania się komórek archesporialnych. Na niektórych preparatach zauważono, iż zalążki nie wytwarzały integumentów i przybierały postać buławy, nie tworząc zalążka typu anatropowego. Zapewne w materiale zebrany tego roku (1941) zalążki były sterylne.

IV. Dyskusja

Przeprowadzone obserwacje nad mikrosporogenezą u *Bosea cypria* stanowią poszerzenie wiadomości uzyskanych przez K a j a l e i J o s h i (l.c.) z badań nad różnymi przedstawicielami rodziny *Amaranthaceae*. Wiele z obserwacji nad *Bosea cypria* pokrywa się z wynikami badań powyższych autorów, chociaż należy jednak zwrócić uwagę na pewne różnice i stwierdzić, że w wykształceniu się pylnika w stadiach wczesnych u *Bosea cypria* pojawia się 4—5 warstw komórek na zewnątrz od archesporu oraz że przejściowy pokład ścienny jest 1 lub 2-warstwowy. Powyżsi autorzy u badanych przedstawicieli widzieli tylko jedną warstwę przejściową. Nie zauważono u *Bosea* układu komórek archesporialnych w szeregi. Prace K a j a l e podkreślają pewne uporządkowanie i uszeregowanie tychże komórek. Stwierdzono też występowanie w jednojądrowych komórkach tapetum więcej niż jednego jąderka, podobnie jak u *Cyathula tomentosa* (K a j a l e, 1940); to zdarza się według autorów rzadko. W obecnej pracy

zwrócono szczególną uwagę na fakt, iż przy zastosowaniu reakcji Feulgena jądro generatywne w pyłkach oraz jądra plemnikowe wybarwiają się bardzo silnie. Jądro komórki wegetatywnej w pyłkach 2-jądrowych i 3-jądrowych barwi się słabo lub wcale. Wyjaśnieniem tego faktu zajmowali się niektórzy autorzy. Według Sterna (1959) następuje tu wzrost od 25 do 50% rozpuszczalnych desoksurybonukleozydów. Jest wciąż kwestią sporną skąd pochodzi DNA w powstających i rozwijających się pyłkach. Prawdopodobnie nie tworzy się tu *de novo* i dlatego należy szukać źródeł pochodzenia jego w komórkach leżących poza obrębem pyłku. Cooper (1952, wiadomość zaczerpnięta z pracy Linskena H. 1958), na podstawie obserwacji nad mejozą w pylnikach u *Lilium henryi* i *L. regale* uważa, iż DNA przechodzi z tapetum do komórek macierzystych pyłku. Te cząstki substancji barwiące się metodą Feulgena, które według Coopera przechodziły z tapetum do powstających pyłków, inni autorzy — jak twierdzi Vasil (1959) — uważali za artefakty powstałe na skutek utrwalania materiału. Linsken (1958) stwierdził u *Lilium henryi*, że w okresie początkowej profazy komórki macierzystej pyłków DNA wydzielane przez degenerujące komórki tapetum, pojawiają się w postaci nukleotydów i innych składników. Składniki te są powtórnie syntetyzowane przez komórki macierzyste pyłków.

W obserwacjach nad pyłkami u *Bosea cypria* zauważono, iż jądra komórek tapetum przy zastosowaniu reakcji Feulgena w miarę ich dalszego kurczenia się i zmniejszania wybarwiają się coraz to intensywniej na kolor czerwony. Resztki komórek tapetum, po sformowaniu się już pyłków 3-jądrowych, są często dostrzegalne tylko dzięki pozostałości fragmentów skurczonych i zniekształconych jąder przylegających do endoteczum.

Atlas chromosomów Darlingtona (1955) podaje liczby chromosomów tylko dla kilku rodzajów rodziny *Amaranthaceae*. Liczby te są dość zmienne i dla poszczególnych rodzajów różne. Najmniej, gdyż $2n = 12$ posiada *Digera*, a najwięcej $2n = 42$ *Achyranthes*. Żaden z wymienionych rodzajów nie ma liczby $2n = 26$, jaką obecnie stwierdzono u *Bosea cypria*.

Zalążki u *Bosea cypria* okazały się typu anatropowego wtedy, gdy u reszty zbadanych przedstawicieli rodziny *Amaranthaceae* dotychczas znajdowano typ kampylotropowy.

V. STRESZCZENIE WYNIKÓW

Na podstawie zebranych przez prof. S. Krupków pyłków *Bosea cypria* na Cyprze w 1941 r. prześlędzono rozwój i budowę pyłków oraz liczbę chromosomów tego gatunku.

Z przeprowadzonych badań można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Komórki macierzyste pyłków dzieląc się mejotycznie wytwarzają

pyłki 3-jądrowe. Powierzchnia pyłków jest gładka, egzyzna należy do typu „psilate“, ilość por wynosi 10.

2. Opisano budowę jądra wegetatywnego, generatywnego i jąder plemnikowych. Zwrócono uwagę na różnice w zabarwieniu się tych komórek po zastosowaniu metody Feulgena. Intensywne zabarwienie jądra generatywnego i jąder plemnikowych, a słabe — lub w ogóle brak zabarwienia — jądra wegetatywnego wykazują, iż w jądrze generatywnym i w jądrach plemnikowych występuje znacznie wyższa koncentracja DNA niż w jądrze wegetatywnym.

3. Liczba biwalentów w mejozie wynosi 13, a liczba chromosomów w płytkach metafazalnych mitozy 26.

4. W badanym materiale nie stwierdzono wykształcenia się woreczka załążkowego. Załączki są sterylne.

5. W pracy podano kilka szczegółów dotyczących budowy kwiatu, oraz właściwości zakwitania i zapylania u *Bosea cypria*.

Panu Prof. drowi S. Krupko za dostarczenie materiału, oraz udzielanie wielu cennych porad i wskazówek podczas wykonywania pracy składam serdeczne podziękowania.

Katedra Botaniki Ogólnej

Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu

(Wpłynęło 15.XI.1959 r.)

SUMMARY

The buds of *Bosea cypria* in different development's stages were collected, fixed in Nawaschin's fluid and embedded by Prof. S. Krupko during his staying in Cyprus for some months in 1941. Sections were cut 10μ thick. The anther wall is 4 or 5 layers thick. The hypodermal layer forms the endothecium and the innermost one develops into the tapetum. The cells of the tapetum are binucleate. The middle layer disappears early. The archesporium consists of several cells. The pollen mother cells divide simultaneously and the young microspores are usually arranged in a tetrahedral or sometimes in a isobilateral fashion. The mature pollen grains are 3-nucleate. The generative nucleus and the sperms stain very deeply by Feulgen method. The tube nucleus doesn't stain by it or stains very weakly. This is probably due to a great concentration of DNA. The pollen grains are smooth, the number of pores is 10. There is no indication in the pollen grains of the presence of starch or fats. The ovules are anatropus. There are 2 integuments; the inner one is forming the micropyle. The ovules remain in all stages of flowers completely sterile, therefore the development of embryo sack was not observed. The number of bivalents in the I meiotic metaphase is 13. The chromosome number of mitotic metaphase plates in male archespor and in epiderm of young anther is 26. The results of the present research are similar to Cajale and Joshi ones concerning different species of *Amaranthaceae*.

Acknowledgments: I wish to express my thanks to Prof. dr S. Krupko for the material of *Bosea cypria* and for valuable advices and supervision throughout the course of my work.

Department of General Botany

Adam Mickiewicz University, Poznań

LITERATURA

- Darlington C., D., Wylie A. P., 1955, Chromosome Atlas of Flowering Plants. Engler A., 1934, Die Natürlichen Pflanzenfamilien, t. 16c, wydanie drugie, 7—85.
- Foster T. S., Stern H., 1958, Soluble deoxyribosidic compounds in relation to duplication of deoxyribonucleic acid, Science 128: 653—654.
- Geitler L., 1935, Beobachtungen über die erste Teilung in Pollenkorn der Angiospermen, Planta 24: 361—386.
- Joshi A. C., Kajale L. B., 1937, Fertilisation and seed development in *Amaranthaceae*, Proceed. of the Indian Acad. Sc, 5 (3) Sec. B: 91—100.
- Kajale L. B., 1940, A contribution to the embryology of the *Amaranthaceae*, Proceed. National Inst. Sc. India 6, (4): 597—625.
- Kajale L. B., 1935, The female gametophyte of *Alternanthera Sessilis* R. Proceed. of the Indian Acad. Sc. 2, (5), sec. B; 476—480.
- Kajale L. B., 1937, Embryology of *Achyranthes Aspera* Linn. Proceed. of the Indian Acad. Sc. 5, (5): 195—205.
- Kajale L. B., 1937, The antipodals of *Pupalia Lappaceae* Juss, The Current Science, 6 (5): 222.
- Krupko St., 1942, Uwagi o florze Cypru, Kosmos, Tel-Aviv.
- Linskens H. F., 1958, Über die Änderung des Nukleinsäuregehaltes während der Pollenmeiose und Pollenentwicklung von *Lilium Henryi*, Acta Botanica Neerlandica, 7: 61—68.
- Maheshwari P., 1950, An introduction to the embryology of Angiosperms.
- Schürhoff P. N., 1926, Die Zytologie der Blütenpflanzen, 527—29.
- Stern H., 1959, Mitosis and metabolic organization. Bot. Rev. 25, (2): 351—84.
- Vasil I. K., 1959, Nucleic acids and survival of excised anthers in vitro. Science, 129, (3361): 1487—1488.

TABLE I—II — PLATE I—II

TABLICA I — PLATE I
Bosea cypria Boiss.*:

1— pięć warstw ściany pylnika (reakcja Feulgena) 880 ×; 2 — leptoten (reakcja Feulgena) 1900 ×; 3a, 3b — zygoten (reakcja Feulgena) 2650 ×; 4 — diploten (reakcja Feulgena) 1900 ×; 5 — diakineza (reakcja Feulgena) 1500 ×; 6 — I metafaza mejozy (reakcja Feulgena) 1900 ×;

1 — five layers in the anther wall (Feulgen's react.) 880 ×; 2 — leptotene (Feulgen's react.) 1900 ×; 3a and 3b — zygotene (Feulgen's react.) 2650 ×; 4 — diplotene (Feulgen's react.) 1900 ×; 5 — diakinesis (Feulgen's react.) 1500 ×; 6 — the I meiotic metaphase (Feulgen's react.) 1900 ×;

* Fotografie 1—6: mikroskop z kontrastem fazowym.

* Photos fig. 1—6: phase contrast.

TABLICA II — PLATE II

Bosea cypria Boiss.*:

7 — telofaza II mejozy (reakcja Feulgena) 1650 $\times$; 8 — układ izobilateralny i tetrahedralny (reakcji Feulgena) 1650 $\times$; 9 — endotecjum i pyłki 2-jądrowe (fiolet kryształiczny) 250 $\times$; 10 — silnie wybarwione jądra w zanikających komórkach tapetum (reakcja Feulgena) 1060 $\times$; 11 — pyłek 1-jądrowy, jądro w kształcie soczewki (reakcja Feulgena) 1900 $\times$; 12, 15a, 15b — pyłek 3-jądrowy, jądra plemnikowe silnie wybarwione, słabo widoczne jądro wegetatywne (reakcja Feulgena) 1900 $\times$; 13, 14 — pyłek 2-jądrowy, silnie wybarwione jądro komórki generatywnej (reakcja Feulgena) fot. 13: 1900 $\times$, fot. 14: 1650 $\times$

7 — the second meiotic telophase (Feulgen's react.) 1650 $\times$; 8 — tetrahedral and isobilateral tetrads (Feulgen's react.) 1650 $\times$; 9 — fibrous endothecium and two nucleus in pollen grain (crystal violet) 250 $\times$; 10 — deeply stained nuclei in disappearing tapetum (Feulgen's react.) 1060 $\times$; 11 — uni nucleate pollen grain; the nucleus in a lenticular's shape (Feulgen's react.) 1900 $\times$; 12, 15a, 15b — three nucleate pollen grain, the sperms stained very deeply, the tube nucleus weakly, arrow (Feulgen's react.) 1900 $\times$; 13, 14 — two nucleate pollen grain, the generatives cell nucleus deeply stained (Feulgen's react.), fig. 13: 1900 $\times$, fig. 14: 1650 $\times$

* Fotografie 7—13: mikroskop z kontrastem fazowym, fotografie 14, 15a, 15b: mikroskop z obiektywem fluorytowym.

* Photos fig. 7—13: phase contrast, photos fig. 14, 15a, 15b: fluorite objective.