Fazy rozwoju woreczka zalążkowego w zestawieniu z rozwojem pyłku u *Lilium candidum*

Phases of embryo-sac development and pollen grains development
in *Lilium candidum*

B. RODKIEWICZ

WSTĘP

Rozwój mikrospor we wszystkich pylnikach kwiatu lilii odbywa się w sposób dość zsynchronizowany. W niektórych fazach synchronizacja jest nieomal idealna — stadium I profazy mejotycznej (Tabl. I, fig. 2), stadium tetrad; w innych stadiach synchronizacja jest mniej wyraźna — I i II metafaza, anafazy. Dolna część pylnika zawiera komórki, które czasami rozwijają się nieco szybciej niż w części środkowej i górnej. Pewien stopień synchronizacji daje się również zauważyć w rozwoju zalążków w środkowej strefie zalążni. Przede wszystkim usiłowano stwierdzić, jaki jest stopień tej synchronizacji, a następnie, czy określonemu stadium rozwoju pyłku odpowiada określone stadium rozwoju megaspor. Okazało się, że istnieje odpowiedniość niektórych stadiów obu typów komórek. Ponieważ jednak pręciki lilii dojrzewają szybciej niż słupki, to bardziej zaawansowanym fazom rozwoju haploidalnych komórek pylnika odpowiadają określone, ale młodsze fazy komórek haploidalnych zalążków w środkowej części zalążni.

Mikrosporogeneza u lilii odbywa się w sposób taki, jak u większości roślin okrytozalążkowych. Rozwój woreczka zalążkowego natomiast przebiega według mało rozpowszechnionego typu *Fritillaria*. Typ ten został po raz pierwszy prawidłowo opisany przez Bambacioni (1928), a następnie przez Coopera (1935) i innych u rozmaitych gatunków *Fritillaria*, *Lilium*, *Tulipa* (Maheshwari 1950), ostatnio zaś ze szczególnym uwzględnieniem roli jąderka przez Flinta i Johansena (1958). Komórka macierzysta megasporu różnicuje się pod skórą zalążka, po podziale redukcyjnym tworzą się cztery jądra megaspor. Ani po pierwszym, ani po drugim podziale nie zakładają się przegrody pomiędzy powstałymi jądrami. Dzięki temu cztery jądra megasporialne są zawarte w jednej wydłużonej komórce (Tabl. II, fig. 11). Wszystkie one biorą

udział w formowaniu woreczka zalążkowego. Proces ten jest dość zawily, przede wszystkim trzy jądra grupują się w części chalazalnej, a jedno pozostaje w części mikropylarnej woreczka (fig. 12). Wszystkie jądra woreczka dzielą się, ale sześć grup chalazalnych chromosomów zlewa się w dwa jądra triploidalne. W rezultacie powstaje wtórne czterojądrowe stadium rozwoju woreczka zalążkowego (fig. 13). Po jeszcze jednym podziale powstaje ośmiojądrowy woreczek zalążkowy, w którym aparat jajowy i jedno jądro biegunowe jest haploidalne, a drugie jądro biegunowe i antypody są triploidalne. Fig. 14 przedstawia centralną komórkę woreczka z obu jądrami biegunowymi. Mogą istnieć odchylenia od przedstawionego wzoru uzależnione od stopnia poliploidyzacji i odmiany rośliny (Darlington i La Cour 1940).

METODY

Zalążnie i pylniki *Lilium candidum*, rosnące w ogrodzie, utrwalano w mieszaninie alkoholu etylowego i kwasu octowego (3 : 1) i przechowywano w 70% alk. etyl. Dla zbadania dużej ilości zalążków i oceny stadiów rozwojowych woreczków zalążkowych najwygodniejszą wydawała się metoda preparatów gniecionych (wg Darlingtona i La Coura 1947). Metodę tę stosowali Mc Leish i S n o a d (1959) przy fotografowaniu makrosporogenezy lilii. Całe zalążnie, albo ich części, hydrolizowano zimnym 1n HCl w ciągu kilku minut. Część materiału hydrolizowano na gorąco i przeprowadzano reakcję Feulgena in toto. Po odczynniku Schiffa materiał płukano w trzech zmianach płynu do płukania po 10 min w każdej. Po reakcji Feulgena lub po hydrolizie na zimno wyrastające szeregiem zalążki oddziela się łatwo od reszty tkanek zalążni. Młode zalążki, trudne do odróżnienia, wypreparowuje się razem z łożyskiem stosując słabe powiększenie mikroskopu. Odcięte zalążki rozgniata się w kropli 40% kwasu octowego. W preparatach otrzymuje się zawiesinę grup komórek i pojedynczych komórek, wśród nich wyróżniają się wymiarami komórki macierzyste megaspor. Wysychaniu preparatu zapobiega dodanie gliceryny. Część preparatów podbarwiano dodatkowo zielenią jasną (mieszanina zieleni z gliceryną i kwasem octowym).

Aby ustalić rozmieszczenie różnych stadiów rozwojowych woreczków zalążkowych rozcinano zalążnie poprzecznie na trzy części. Część dolna stanowiła 1/4 całej długości zalążni, część środkowa połowę, a część górna znów 1/4 długości zalążni. W preparatach z każdej części liczono poszczególne stadia rozwoju woreczka zalążkowego.

Macierzyste komórki megaspor w okresie różnicowania się i I profazy (fig. 3—9) podzielono na grupy w zależności od wymiarów (tabela).

Następne stadia wyróżniano na podstawie ilości jąder. W preparatach z młodych zalążni, gdzie odbywa się megasporogeneza, komórki pozostawały nie uszkodzone i łatwe do sklasyfikowania, natomiast w preparatach ze starszych zalążni część woreczków nie oddzielała się od zalążków, bądź była uszkodzona przy rozbijaniu tkanek. Ilość nie oznaczonych stadiów wynosiła wtedy 10—20%.

WYNIKI

Megasporogeneza, a następnie rozwój woreczków zalążkowych, nie odbywa się jednocześnie we wszystkich zalążkach jednej zalążni. Część dolna zalążni posiada zalążki opóźnione w rozwoju. Komórki sporogenne i woreczki zalążkowe w zalążkach części środkowej zalążni dojrzewają najszybciej i w sposób najbardziej wyrównany. Zalążki w części górnej również opóźniają się w rozwoju, ale w mniejszym stopniu niż zalążki dolnego odcinka zalążni. Jeśli więc porównać stopień rozwoju zalążków w całej zalążni, to znajdzie się tam różnorodne stadia. Np. w zalążni o długości 7—8 mm najliczniejsza jest grupa komórek macierzystych megaspor w późnym stadium I profazy. Krańcowo niedorozwinięte są zalążki z różnicującą się komórką macierzystą megaspor, a najbardziej rozwiniętymi są zalążki z czterojądrowymi woreczkami zalążkowymi. W zalążni o długości 11 mm najliczniejszymi są czterojądrowe woreczki, a krańcowymi sporogenne komórki w późnym stadium I profazy i ukształtowane woreczki zalążkowe.

W preparatach wykonanych ze środkowego odcinka zalążni uwidacznia się dość wyraźnie wyrównanie stadiów rozwojowych zalążków. Stadia wcześniejsze obejmujące okres megasporogenezy są lepiej zsynchronizowane od stadiów rozwoju woreczków zalążkowych. Synchronizacja zaznacza się szczególnie w profazie mejozy i I i II stadium czterojądrowym woreczka zalążkowego. Wtedy ponad połowa zalążków jest w tym samym stadium rozwoju. Należy przypuszczać, że wiąże się to z długotrwałością tych stadiów. Inne krótsze fazy nie są zsynchronizowane, odnosi się to głównie do okresu od metafazy I do utworzenia się pierwotnego czterojądrowego woreczka. Z pewnym przybliżeniem można więc mówić o synchronizacji niektórych stadiów rozwoju zalążków znajdujących się w środkowym odcinku zalążni.

Fakt ustalenia częściowej synchronizacji rozwoju zalążków pozwolił na szukanie równoległości rozwoju gametofitów w zalążni i pylnikach. Wiadomo bowiem było, że wiele stadiów rozwoju pyłku odbywa się równocześnie we wszystkich pręcikach kwiatu. Porównywano stadia megasporogenezy i mikrosporogenezy w odpowiadających sobie zalążniach i pylnikach wyciętych z pąków kwiatowych różnej wielkości. Określano

i liczono stadia megasporogenezy w środkowym odcinku zalążni (około 1/2 długości całego organu). Stadia mikrosporogenezy określano w preparatach ze środkowej części pylników. Część środkową brano dlatego, ponieważ czasami obserwuje się szybszy rozwój dolnej części w porównaniu z wierzchołkiem. Rezultaty są przedstawione na tabeli 1. Wyróżnicowanie się komórki macierzystej megaspory (fig. 3) i mikrospory (fig. 1) odbywa się mniej więcej w tym samym czasie, w zalążniach o długości około 3 mm i w pylnikach o długości około 4 mm. Jednak tempo rozwoju komórki macierzystej woreczka zalążkowego jest bardzo powolne w porównaniu z mikrosporogenezą. Podczas gdy komórki macierzyste megaspor dochodzą do końca I profazy mejotycznej, w pylnikach zostaje ukończona mikrosporogeneza. Proces przygotowywania się komórki macierzystej megaspor do podziału redukcyjnego wiąże się z ogromnym zwiększeniem jej wymiarów i wytworzeniem dużych ilości cytoplazmy. Wydaje się, że komórka macierzysta w okresie I profazy nagromadza przeważającą część protoplazmy późniejszego woreczka zalążkowego.

Ponieważ mikrosporogeneza kończy się przed ukończeniem I profazy w komórce macierzystej megaspor, należało początkowy okres megasporogenezy podzielić na kilka odcinków. Następnie dla wyznaczonych klas komórek megasporogennych w okresie od początku różnicowania się do końca I profazy trzeba było znaleźć równoczesne z nimi stadia mikrosporogenezy. Najłatwiejszym kryterium podziału była długość rozwijających się komórek macierzystych. Na podstawie różnic długości podzielono je na 7 grup (tabela 1). Jedynym często spotykanym i od razu rzucającym się w oczy stadium profazy mejotycznej było sinapsis (fig. 8). Komórki w tym stadium trafiały zwykle do grupy o największych wymiarach (110—160 μ).

Rozwój woreczka zalążkowego odbywał się w okresie, gdy w pylnikach znajdował się dojrzały dwujądrowy pyłek. O stadium rozwoju woreczka zalążkowego można się było zorientować tylko w przybliżeniu na podstawie wielkości zalążni.

STRESZCZENIE I WNIOSKI

U lilii rozwój komórek podczas mikrosporogenezy jest w znacznym stopniu zsynchronizowany. Megaspory i woreczki zalążkowe rozwijają się nierównomiernie. Najszybciej dojrzewają te, które znajdują się w środkowej części zalążni. Wykonywano preparaty gniesione z zalążków środkowego odcinka zalążni (około 1/2 całej długości zalążni). W tych zalążkach porównywano stadia macierzystych komórek megaspor i woreczka zalążkowego. Obserwuje się pewną synchronizację niektórych stadiów

Tabela 1 — Table 1

Porównanie faz rozwojowych woreczka zalążkowego w środkowej części zalążni z fazami rozwoju pyłku u *Lilium candidum*
 Comparison of developmental stages of embryo-sac in median part of ovary with developmental stages of pollen grains in *Lilium candidum*

Stadium megagametogenezy Stage of megagametogenesis														Stadium mikrosporo- genezy Stage of microsporo- genesis	Długość pylnika w mm Length of anther, mm
Nr fotografii (Tabl. I) No. of photographs (Plate I)		3,4		5	6		7	8,9	10	11	12	13	14		
Długość kom. mac. megaspor., μ Length of megaspore mother cell, μ		30	40	60	75	90	110	160							
Długość zalążni w mm Length of ovary, mm														dzielący się archespor divisions of sporogenous cells	4
3—4		28												początek me- jozy beginning of meiosis	4
3—4		10	43											początek me- jozy beginning of meiosis	5
5			22	38										pachyten pachytene	7
5				20	37									diakineza diakinesis	9
6				35	42									metafaza I metaphase I	10
6				11	51									telofaza II telophase II	11
6					12	34								tetrazy microspore tetrads	12
7					17	35								tetrazy microspore tetrads	11
7						18	34							tetrazy microspore tetrads	13
7							15	26						mikrospory microspores	16
8							16	31						mikrospory microspores	15
8							17	42						mikrospory microspores	16
9							1	31	6	1				dwujądrowy pyłek two celled pol- len grains	17
10								22	7	4				dwujądrowy pyłek two-celled pollen grains	18
11									4	6	38	18	6	dwujądrowy pyłek two celled pollen grains	20
12										2	25	15	5	dwujądrowy pyłek two celled pollen grains	20
13											5	33	3	dwujądrowy pyłek two celled pollen grains	21

rozwojowych zalążków. Stopień synchronizacji jest prawdopodobnie tym większy im dłużej trwa dane stadium. Istnieje odpowiedniość pomiędzy fazami mikrosporogenezy i megasporogenezy, ale nie udało się ustalić ścisłej równoległości poszczególnych stadiów. Jednak na podstawie stadium rozwojowego pylnika można w przybliżeniu ustalić stadium rozwojowe zalążków w środkowej części zalążni. Rozwój komórek macierzystych mikro- i megaspory zaczyna się prawie jednocześnie, ale kiedy komórka macierzysta makrospor kończy profazę pierwszego podziału mejotycznego, w pylniku znajduje się dojrzały pyłek.

Katedra Anatomii i Cytologii Roślin UŁ
Łódź

(Wpłynęło: 17.3.1961 r.)

SUMMARY

The course of microsporogenesis in *Lilium candidum* is synchronised to a large extent. The megaspores and embryo sacs develop unevenly. The earliest to ripen are those situated in the middle of the ovary. The respective stages of development of the mother cells of embryo-sac and of the embryo-sac itself in the central part of the ovary (approx. half-way its length) were compared by means of smear preparations. A certain degree of synchronisation in the development of the respective stages, probably proportional to some extent to their duration, was observed.

There is definitely some correspondence between the different phases of mega- and microspores but no strict parallelism was found. The development of mother cells of micro- and megaspores starts almost simultaneously but while the megaspore mother cell is at the end of first division of meiosis, pollen grains in the anther are already mature.

LITERATURA

- Bambacioni V., 1928, Ricerche sulla ecologia e sulla embriologia di *Fritillaria persica* L., Ann. di Bot. 18: 7—35.
- Cooper D. C., 1935, Macrosporogenesis and development of the embryo-sac of *Lilium henryi*, Bot. Gazet. 97: 346—355.
- Darlington C. D., La Cour L., 1941, The genetics of embryo-sac development, Ann. bot. N. S. 5: 547—562.
- Darlington C. D., La Cour L. F., 1947, The handling of chromosomes, London, G. Allen & Unwin, pp. 180.
- Flint F. F., Johansen D. A., 1958, Nucleocytoplasmic relationship in the *Fritillaria* type of megagametogenesis, Amer. Jour. Bot. 45: 464—472.
- Maheshwari P., 1950, An introduction to the embryology of Angiosperms, N. York, McGraw Hill, pp. 453.
- McLeish J., Snoad B., 1958, Looking at chromosomes, London, Mcmillan, pp. 87.

Objaśnienia do tablic I—II
 Explanations of the plates I—II

Komórki *Lilium candidum*
 Cells of *Lilium candidum*

Fig. 1. Początek mejozy w komórkach macierzystych mikrospor
 The beginning of meiosis in microspore mother cells

Fig. 2. Zsynchronizowana profaza (diakinaza) mejozy w pylniku
 Synchronised prophase (diakinesis) of meiosis in anther

Fig. 3—9. Różnicowanie się komórki macierzystej mikrospory
 Differentiation of microspore mother cell

Fig. 10. Dwa jądra po pierwszym podziale redukcyjnym
 Two nuclei after first reduction

Fig. 11. Cztery jądra makrospor — I czterojądrowy woreczek zalążkowy
 Four macrospore nuclei — primary 4-nucleus embryo-sac

Fig. 12. Trzy jądra chalazalne i jedno mikropylarne w woreczku zalążkowym
 Three chalazal and one micropylar nuclei in embryo-sac.

Fig. 13. Wtórne czterojądrowe stadium woreczka zalążkowego, dwa duże jądra triploidalne
 Secondary 4-nucleus embryo-sac stage, two large triploidal nuclei

Fig. 14. Część dojrzałego woreczka zalążkowego z dwoma jądrami biegunowymi
 Part of mature embryo-sac with two polar nuclei

Wszystkie zdjęcia (z wyjątkiem fig. 2) tak samo powiększone
 The same magnification of all photographs (except fig. 2)

Tablica I — Plate I