Badania cytochemiczne woreczka zalążkowego *Lilium regale* w różnych fazach rozwoju

Cytochemical investigations of the embryo sac of Lilium regale in various development phases

H. KURAN, K. MARCINIAK

WSTĘP

Rozwój i przemiany struktur mikroskopowych woreczka zalążkowego lili były opisane wielokrotnie (Mottier 1898; Bouin i Bouin 1898); (Orman 1912; Eymé 1965). Bambacioni w roku 1928 opisał typ rozwoju *Fritillaria*, według którego rozwijają się woreczki zalążkowe lili. Komórka macierzysta megaspor różnicuje się pod skórą zalążka; po podziale redukcyjnym tworzą się cztery jądra megaspor nie oddzielone od siebie przegrodami. Dzięki temu cztery jądra megasporialne są zawarte w jednej wydłużonej komórce i wszystkie one biorą udział w formowaniu się woreczka zalążkowego (tab. I i II).

Stosunkowo niedawno zwrócono uwagę na zmiany cytochemiczne towarzyszące poszczególnym fazom rozwoju żeńskiego gametofitu (Zinger 1958; Takao 1962; Jensen 1963; Pritchard 1964; Poddubnaja-Arnol'di 1964; Beljaeva 1963, 1965; Alvarez i Sagawa 1965). Badano głównie zmiany, jakim ulegają kwasy nukleinowe, białka i nierozpuszczalne polisacharydy u szeregu roślin wyższych.

MATERIAŁ I METODY

Zalążki z pąków kwiatowych *Lilium regale* utrwalano w płynach: Bakera, Bouina, Champy i w alkoholu z kwasem octowym (3:1). Do przeprowadzenia reakcji na białka i tłuszcze używano materiału utrwalonego w płynie Bakera z dodatkiem 7,5 % sacharozy, w czasie 18—24 godz., w temp. 0—4°C. Następnie prze-mywano materiał w 1 % zobojętnionej formalinie. Po przepłukaniu w wodzie desty-lowanej zalążki zatapiano w parafinie i wykonywano preparaty mikrotomowe.

Białka określano na podstawie reakcji z błękitem bromofenolowym (Mazia i wsp. 1953), stosowana była również ninhydryna-Schiff (Yasuma i Ichikawa, wg Jensena 1962) i chloramina-Schiff (Burstone, wg Jensena 1962). Histony wykrywano w reakcji z fast-green FCF (Alfert i Geshwind, wg Jensena 1962). Kontrolę stanowiły preparaty trawione trypsyną (wg Pearse'a 1962).

Materiał przeznaczony do badania tłuszczów podlegał postchromizacji w mieszaninie dwuchromianowo-wapniowej według metody Bakera (1946, wg Pearse 1962). Tłuszcze wykazywano przez barwienie preparatów Sudanem III i IV (Kay i Whitehead), oraz Sudanem Czarnym B (Mc Manus, wg Pearse'a 1962). Kontrolę stanowiły preparaty niepostchromizowane, ekstrahowane pirydyną według metody Bakera (1946, wg Jensena 1962).

Reakcję PAS-Schiff (Hotchkiss, wg Pearse'a 1962) na nierozpuszczalne polisacharydy, przeprowadzano na materiale utrwalonym w alkoholu z kwasem octowym (3:1) przez 24 godz. Hamowanie reakcji przez acetylowanie wykonano według metody Gersh'a (Pearse 1962).

OBSERWACJE

Polisacharydy

Ściana otaczająca megasporocyt i woreczek zalążkowy wykazywała we wszystkich stadiach rozwoju zalążka pozytywną reakcję PAS; również ściany somatycznych komórek zalążka wykazują podczas całego rozwoju pozytywną reakcję PAS. Natomiast nierozpuszczalne polisacharydy nie zostały wykryte w cytoplazmie megasporocytu i woreczka zalążkowego *L. regale*. W stadium ośmioletniowym komórki antypodalne woreczka zalążkowego oddzielone są od siebie ścianami dającymi wyraźną reakcję PAS-pozytywną. Szczególnie silnie barwiła się ściana pomiędzy dolną a środkową antypodą, ściana pomiędzy górną antypodą a komórką centralną daje słabą reakcję PAS. Równie mało intensywne było zabarwienie ścian aparatu jajowego. Rozmieszczenie nierozpuszczalnych polisacharydów zmienia się w zależności od stadium rozwoju zalążka (Tabl. I). W stadium młodego megasporocytu obserwuje się niewiele polisacharydów i to tylko w części tkanek sznureczka. W stadium późniejszym zwiększa się pozytywna reakcja w strefie sznureczka, poza tym nieliczne skupienia skrobi znajdują się w osłonkach. W zalążku, którego woreczek zalążkowy znajduje się w pierwotnym stadium czterojądrowym, substancje PAS-pozytywne występują w największym nasileniu w części wierzchołkowej osłonek. We wtórnym stadium czterojądrowym obserwuje się nieznaczne zwiększenie strefy PAS-pozytywnej osłonek. W zalążku z dojrzałym ośmioletniowym woreczkiem zalążkowym obserwuje się największe nagromadzenie substancji PAS-pozytywnej. Po raz pierwszy w rozwoju zalążka substancja PAS-pozytywna występuje w części brzeżnej osrodka, ale jego strefa chalazalna jest wolna od skrobi. W częściach wierzchołkowych osłonki ilość skrobi maleje w porównaniu z wtórnym stadium czterojądrowym. W partiach brzeżnych sznureczka zwiększa się ilość skrobi.

Tłuszcze

W najmłodszym stadium rozwoju tłuszcze występują zarówno w megasporocycie, jak i zalążku w niewielkiej ilości, w postaci bardzo drobnych kropelek o średnicy 0,7 μ , przy jednoczesnej bardzo silnej sudanofilii cytoplazmy. Nieco później, obok

Tablica I — Plate I

Rozmieszczenie PAS-pozytywnych substancji w zalążku *Lilium regale*

Kropkami oznaczono lokalizację nierozpuszczalnych polisacharydów
a — megasporocyt w okresie pierwszej profazy mejotycznej, *b* — czterojądrowe pierwotne stadium rozwoju woreczka zalążkowego, *c* — czterojądrowe wtórne stadium rozwoju woreczka zalążkowego, *d* — woreczek zalążkowy podzielony na komórki

Distribution of PAS-positive substances in the *Lilium regale*-embryos

Dots denote the localization of insoluble polysaccharides
a — megasporocyte in the first meiotic prophase, *b* — four-nucleate primary stage of embryo sac development, *c* — four-nucleate secondary stage of embryo sac development, *d* — embryo sac divided into cells

drobnych kropli, pojawiają się duże twory lipidowe o ϕ 1,3 μ (Tabl. II i III: fot. 1). W starszym stadium rozwoju zalążka wybarwia się intensywnie przy pomocy Sudanów megasporocyt oraz chalazalna część ośrodk. W osłonkach widać tylko nieliczne kropelki tłuszczu. W całym wyrośniętym megasporocycie obserwuje się nagromadzenie dużej ilości substancji lipidowych (fot. 2). W stadium pierwszej metafazy (fot. 8) widoczne są duże struktury całkowicie sudanofilne oraz drobniejsze, z których część znajduje się w środku dużych struktur białkowych. W komórkach chalazy sudanofilne struktury są często o wiele większe niż w megasporocycie (fot. 2) — średnica ich odpowiednio wzrasta od 3 μ do 6 μ . W pierwotnym stadium czterojądrowym duże obszary cytoplazmy są pozbawione lipidowych kuleczek (fot. 3). W późnym pierwotnym czterojądrowym stadium, przy ułożeniu się jąder w pozycji 1:3, dużo tłuszczu grupuje się wokół 3 jąder w końcu chalazalnym woreczka zalążkowego. W pozostałych częściach zalążka tłuszcze występują w postaci drobnych kropelek.

Tablica II — Plate II

Schemat lokalizacji białek i tłuszczów w poszczególnych stadiach rozwoju woreczka zalążkowego *Lilium regale*

Linie ułożone promieniście w stosunku do jądra wyobrażają ergastoplazmę, kropkami oznaczono tłuszcze, kółkami oznaczono lokalizację białek

Schematy wykonano w niejednakowym powiększeniu

Scheme of proteins and lipids localization in the course of development of the *Lilium regale* embryo sac

Radial lines from nucleus represent ergastoplasm, dots denote protein localization

The enlargement of the schemes is not equal

Tablica III — Plate III

Fot. 1. Młody megasporocyt. Tłuszcze barwione Sudanem Czarnym B ($\times 350$)

Photo 1. Young megasporocyte. Lipids stained with Sudan black B ($\times 350$)

Fot. 2. Megasporocyt w profazie. W megasporocycie i w komórkach ośrodka widać tłuszcze zabarwione Sudanem Czarnym (B) $\times 550$

Photo 2. Megasporocyte in prophase. In megasporocyte and nucellar lipids stained with Sudan black B are visible ($\times 550$)

Fot. 3. Czterojądrowe pierwotne stadium rozwoju woreczka zalążkowego. Tłuszcze zabarwione Sudanem Czarnym B ($\times 960$)

Photo 3. Four-nucleate primary stage of embryo sac development. Lipids stained with Sudan black B ($\times 690$)

Fot. 4 i 5. Czterojądrowe wtórne stadium rozwoju woreczka zalążkowego

Tłuszcze barwione Sudanem Czarnym B, białka — błękitem bromofenolowym. Na fotografii struktury białkowe są szare, tłuszczowe — czarne. Widać tłuszcze zlokalizowane często wewnątrz struktur białkowych (fot. 4×400 , fot. 5×500)

Photos 4 and 5. Four-nucleate secondary stage of embryo sac development

Lipids stained with Sudan black B, proteins — with bromophenol blue. On photograph protein structures are grey, lipid structures — black. Lipids localized frequently within protein structures are visible (Phot. 4×400 , phot. 5×500)

Fot. 6 i 7. Megasporocyt w okresie wczesnej profazy meiotycznej.

Barwiono hematoksyliną żelazistą wg Heidenhaina po utrwaleniu w alkoholu z kwasem octowym (3:1)
Widoczna ergastoplazma (Fot. 6 $\times$ 1200, fot. 7 $\times$ 1350)

Photos 6 and 7. Megasporocyte in early meiotic prophase.

Stained with iron hematoxylin after Heidenhain after fixation in alcohol with acetic acid (3:1)
Ergastoplasm visible. (Phot. 6 $\times$ 1200 and phot. 7 $\times$ 1350)

W czterojądrowym wtórnym stadium rozwoju zaznacza się postępująca wakuolizacja, a ilość lipidów ulega pewnej redukcji. Na terenie woreczka zalążkowego największe zgrupowanie tłuszczu obserwuje się wokół triploidalnych jąder na biegunie chalazalnym. Mniejsza ilość tłuszczu otacza jądra mikropylarne, a stosunkowo duże kule o średnicy $2,3\ \mu - 3\ \mu$, zauważyć można na obwodzie woreczka zalążkowego (fot. 5). Często kropelki lipidów zlokalizowane są w obrębie struktur białkowych (fot. 4). W tkankach zalążka obserwowano podobny rozkład tworów tłuszczowych jak w stadium poprzednim. W bardzo późnym wtórnym stadium czterojądrowym zmniejsza się ilość tłuszczu w chalazalnym końcu woreczka zalążkowego. We wczesnym, ośmiojądrowym stadium rozwoju woreczka zalążkowego (4:4) rozkład tłuszczu jest równomierny na terenie zwakuolizowanej cytoplazmy całego woreczka. W dojrzałym woreczku zalążkowym podzielonym na komórki, większość drobnych kropelek i większych skupisk tłuszczu gromadzi się w antypodach. Obserwuje się również dwa lub jedno szczególnie duże nagromadzenie struktur sudanofilnych w okolicy jądra wtórnego, z reguły od strony chalazalnej. Na całym obwodzie woreczka zalążkowego układają się drobne krople tłuszczu często zlokalizowane wewnątrz struktur białkowych. Okolicę komórki jajowej i synergid otaczają również struktury białkowe z jedną lub kilkoma kuleczkami tłuszczu wewnątrz. W ośrodku tłuszczu są tylko w strefie chalazalnej przylegającej do komórek antypodalnych. Osłonki woreczka zalążkowego w tym stadium wykazują bardzo małą ilość tłuszczu, głównie w postaci drobnych sudanofilnych ziarenek.

Na preparatach kontrolnych ekstrahowanych pirydyną nie ma zabarwienia po reakcji z Sudanami.

Białka

Komórka archesporialna pokazuje intensywną reakcję na białka. Intensywność reakcji wzrasta aż do końca pierwszej profazy w megasporocycie. W rosnącym megasporocycie występuje obfita ergastoplazma (fot. 6 i 7).

Pozytywna reakcja na histony występowała we wszystkich stadiach rozwoju woreczka zalążkowego jedynie w jądrze.

W megasporocycie oprócz struktur ergastoplazmatycznych występują po reakcji bromofenolowej i reakcjach z ninhydryną i chloraminą nieliczne utwory kuliste o charakterze białkowym. Niektóre z nich wydają się być związane ze strukturami włóknistymi ergastoplazmy. W wyrośniętym megasporocycie struktur włóknistych jest stosunkowo mało, zwykle zgrupowane są one przy jądrze od strony chalazalnej, natomiast widać liczne utwory o zarysach kolistych lub nieregularnych o średnicy $1,5-2,2\ \mu$ (fot. 8). Część ciał o charakterze białkowym zawiera inkluzje lipidowe. W okresie od pierwszej metafazy do pierwotnego stadium czterojądrowego obserwowano zmniejszenie intensywności reakcji na białko. Komórki tkanek ośrodka dawały silniejszą reakcję na białko niż megasporocyt.

W pierwotnym czterojądrowym stadium rozwoju woreczka zalążkowego struktury białkowe znikają z miejsc cytoplazmy, gdzie mają się utworzyć wakuole.

Obserwuje się w tym stadium struktury białkowe o większej, do 6 μ średnicy (fot. 10), ponadto częściej niż poprzednio zawierają one inkluzje lipidowe (fot. 11).

W tkankach załączka najsilniejsze zabarwienie po reakcji na białka obserwuje się w chalazalnej części ośrodku; intensywność barwy jest tutaj zbliżona do intensywności barwy woreczka załączkowego. Osłonki oraz skórka wykazują słabsze zabarwienie. Jedynie region komórek sznureczka wykazuje nieco więcej białka.

We wtórnym czterojądrowym stadium rozwoju cytoplazma głównie jest rozmieszczona na biegunach i wzdłuż ścian; centrum woreczka zajmuje duża wakuola. W cytoplazmie przyjądrowej i chalazalnej znajdują się duże struktury białkowe. W tej kategorii struktur obserwuje się inkluzje tłuszczowe. Wokół jąder mikropylarnych grupują się przeważnie małe struktury białkowe. W tym stadium średnica struktur białkowych zawierających inkluzje lipidowe wynosi od 3,7–6 μ . Widoczne są tutaj także kule białkowe zawierające czasami drobne „wakuole”. Intensywność barwy po reakcjach na białka na terenie całego załączka nie ulega zmianie w tym stadium.

Zupełnie inny rozkład białka występuje w dojrzałym ośmiojądrowym woreczku załączkowym. W aparacie jajowym obserwuje się tylko drobne struktury białkowe i bardzo intensywnie barwiącą się cytoplazmę, brak tu natomiast dużych struktur białkowych. W komórce centralnej, w warstwie cytoplazmy przylegającej do aparatu jajowego występują nieliczne struktury białkowe.

Tablica V — Plate V

Fot. 8. Megasporocyt w okresie pierwszej metafazy mejotycznej.

Widoczne struktury białkowe ciemno szare i tłuszczowe — czarne oraz krople tłuszczu zawarte w obrębie struktur białkowych ($\times 1350$)

Photo 8. Megasporocyte in first meiotic metaphase.

Protein structures (grey) and lipid structures (black) are visible as well as lipid droplets within protein structures ($\times 1350$)

Fot. 9. Cytoplazma woreczka załączkowego w stadium czterojądrowym pierwotnym, widziana w mikroskopie elektronowym.

Widać wielowarstwowe ciała cytoplazmatyczne często zawierające mitochondria o podwyższonej osmofilii. Utrwalono w OsO_4 ($\times 10\,000$)

(Fot. E. Mikulska)

Photo 9. Embryo sac cytoplasm in four-nucleate primary stage seen in electron microscope. Multilayer cytoplasmic bodies containing frequently mitochondria with increased osmophilicity are seen. Fixed in

OsO_4 ($\times 10\,000$).

(Photo by Mikulska)

Fot. 10. Czterojądrowe pierwotne stadium rozwoju woreczka załączkowego

Białka barwione błękitem bromofenolowym ($\times 650$)

Photo 10. Four-nucleate primary stage of embryo sac development

Proteins stained with bromophenol blue ($650\times$)

Fot. 11. Czterojądrowe pierwotne stadium rozwoju woreczka załączkowego

Większość struktur białkowych zawiera inkluzje lipidowe ($\times 740$)

Photo 11. Four-nucleate primary stage of embryo sac development

Most protein structures contain lipid inclusions ($\times 740$)

DYSKUSJA

Młody megasporocyt w okresie wczesnej pierwszej profazy daje bardzo silną homogenną reakcję z odczynnikami na białko. W miarę wzrostu trójkątnego megasporocytu uwidaczniają się struktury nazwane ergastoplazmą, układające się promieniście w stosunku do jądra (fot. 6).

Ergastoplazma w megasporogenezie była opisana przez Mottiera (1898), Bouina (1898), Ormana (1912), Eymé (1965), a także Guillermonda (1924), który uważał te struktury za artefakty.

Ergastoplazma składa się z cystern retikulum endoplazmatycznego (Rodkiewicz i Mikulska 1963, 1965, 1966 a, b, c). Cysterny endoplazmatycznego retikulum biorą udział w tworzeniu większych struktur cytoplazmatycznych o warstwowej budowie (fot. 9), które pojawiają się w komórce w końcu mejotycznej profazy i są obserwowane również w dalszych stadiach rozwoju (Mikulska i Rodkiewicz 1964; Rodkiewicz i Mikulska 1966 a).

W miarę wzrostu megasporocytu układ cystern endoplazmatycznego retikulum zmienia się na równoległy do długiej osi komórki. W końcu pierwszej profazy w megasporocycie cysterny zwijają się, w końcu całą powierzchnię megasporocytu zajmują utwory kuliste o charakterze białkowym (fot. 8). Podobne struktury o charakterze lipoproteidowym opisał Eymé (1965) nazywając je „węzłami cytoplazmatycznymi”.

W mikroskopie świetlnym, w megasporocycie w okresie pierwszej metafazy oraz w stadiach późniejszych widoczne są struktury białkowe o wymiarach odpowiadających mniej więcej wymiarom struktur obserwowanych w mikroskopie elektronowym. Fot. 11 przedstawia układ struktur lipoproteidowych w stadium czterojądrowym pierwotnym, widziany w mikroskopie świetlnym. Struktury te widziane w mikroskopie elektronowym pokazuje fot. 9. Widoczne są tu jedno- i wielowarstwowe ciała białkowe. Wewnątrz niektórych ciał białkowych zamknięte są mitochondria o podwyższonej osmofilii, a także niewidoczne na zdjęciu osmofilne lipidy, które w mikroskopie świetlnym mogą być identyfikowane jako drobne struktury tłuszczowe wewnątrz struktur białkowych.

Obserwowane w mikroskopie świetlnym, struktury, dające pozytywną reakcję na białka, różnią się bardzo znacznie wymiarami. Część z nich stanowią niewątpliwie mitochondria oraz plastydy. Niektóre, szczególnie posiadające duże wymiary powinny odpowiadać warstwowym ciałom cytoplazmatycznym, widocznym w mikroskopie elektronowym.

W megasporocycie występują początkowo drobne i nieliczne kropelki tłuszczu, których liczba i wielkość wzrasta znacznie pod koniec profazy podziału heterotypowego. Później, w stadiach czterojądrowych, duże twory lipidowe oraz drobne kuleczki znaleźć można na terenie woreczka zalążkowego, głównie w okolicy jąder chalazalnych. Natomiast w strefie chalazalnej zalążka i w końcu chalazalnym ośrodku znajdowano drobne kuleczki i duże struktury tłuszczowe jeszcze przed ich pojawieniem się na terenie woreczka zalążkowego. Wydaje się więc, że tłuszcze przechodzą do woreczka zalążkowego z partii chalazalnych ośrodków. Z drugiej

strony jest prawdopodobne, że część tłuszczu megasporocyty powstaje na skutek rozpadu lipoproteidowych struktur cytoplazmy.

W megasporocycie występują zarówno struktury dające wyłącznie reakcje na białka lub tłuszcze, jak również struktury białkowe zawierające kuleczki tłuszczu. Z obserwacji białek i tłuszczów wynika, że liczba utworów białkowych i tłuszczowych nie wzrasta od stadium wyrosniętego megasporocyty. Brak wzrostu suchej masy woreczka zalążkowego, od stadium megasporocyty do czterojądrowego stadium rozwoju, był opisywany (Kuran 1967). Liczba struktur tłuszczowych i białkowych na terenie woreczka zalążkowego w starszych stadiach rozwoju ulega zmniejszeniu (por. fot 8 i 11). Zmienia się też ich jakość — zamiast struktur wyłącznie białkowych oraz tłuszczowych występują głównie struktury białkowe z inkluzjami lipidowymi. Można zauważyć, że ilość tłuszczu zmniejsza się, począwszy od późnego, wtórnego stadium czterojądrowego. W tych stadiach rozwoju woreczka zalążkowego zauważono gromadzenie się enzymu typu lipazy, który to enzym w młodszych stadiach rozwoju występował w minimalnych ilościach (Marciniak, Kuran, w druku). Równocześnie zaznacza się deformacja utworów białkowych — pojawiają się ciała białkowe z drobną „wakuolką” wewnątrz.

STRESZCZENIE

W zalążkach i rozwijających się woreczkach zalążkowych *Lilium regale* badano występowanie polisacharydów, białek i tłuszczów. Stwierdzono, że w woreczku zalążkowym polisacharydy występują tylko w ścianie komórkowej, a w stadium dojrzałym również w ścianach komórek na terenie woreczka zalążkowego. W cytoplazmie samego woreczka zalążkowego nie znaleziono skrobi.

W bardzo młodym megasporocycie występują duże ilości białka. Pod koniec profazy mejozytycznej uwidaczniają się liczne mniej więcej kuliste ciała białkowe. W późniejszych stadiach liczba ciał białkowych ulega zmniejszeniu.

W megasporogenezie pojawiają się drobne kuleczki tłuszczu, których liczba i wielkość zwiększa się wraz ze wzrostem megasporocyty. Stanowią one prawdopodobnie główny materiał zapasowy. W chalazalnej części ośrodka wykryto duże nagromadzenie tłuszczu, co sugeruje przechodzenie struktur tłuszczowych do woreczka zalążkowego z tej części zalążka.

Pragniemy serdecznie podziękować Panu Doc. Dr Bohdanowi Rodkiewiczowi za cenne rady i wskazówki udzielane w trakcie badań i za pomoc w zredagowaniu niniejszej pracy, dziękujemy również Pani Doc. Dr Eugenii Mikulskiej za dyskusję pracy oraz za udostępnienie zdjęcia z mikroskopu elektronowego.

Katedra Anatomii i Cytologii Roślin U.Ł.
Łódź

(Wpłynęło dn. 12.4.1968 r.)

SUMMARY

In the ovules and developing embryo sacs of *Lilium regale* the occurrence of polysaccharides, protein and fats was investigated. It was found that polysaccharides occur in the embryo sac in cell wall only and in the mature stage also in the walls of the embryo sac. Starch was not detected in the cytoplasm of the embryo sac.

In very young megasporocytes large quantities of protein are present. Towards the end of the meiotic prophase numerous almost spherical protein bodies become visible. At later stages the number of these bodies decreases.

During megasporogenesis minute lipid balls appear, their number and size increasing with the growth of the megasporocyte. They constitute probably the main storage material. A large accumulation of fats was revealed in the chalazal part of the nucellus, this would seem to suggest that the fatty bodies pass to the embryo sac from this part of the ovule.

LITERATURA

- Alvarez M. R., Sagawa Y., 1965, A histochemical study of embryo sac development in *Vanda* (Orchidaceae), *Caryologia*, 18: 241—249.
- Bambacioni V., 1928, Ricerche sulla ecologia e sulla embriologia di *Fritillaria persica* L., *Ann. di Bot.* 18: 7—35.
- Beljaeva N. S., 1963, Citochimiczskoje izuczenije processa sozrewanija sformirowannogo zarodyszewogo meszka chłopczaтника, *Izw. AN Turkm. SSR*, 3: 27—34.
- Beljaeva N. S., 1965, O nekotorych izmenenijach w zarodyszewom meszke i tkanjach semjapoczki chłopczaтника posle oplodotworenija, *Izw. AN Turkm. SSR*, 4:3—10.
- Bouin M., Bouin P., 1898, Sur le développement de la cellule-mère du sac embryonnaire des Liliacées et en particulier sur l'évolution des formations ergastoplasmiques, *Arch. d'anat. microsc.* 2:419—454.
- Eymé J., 1965, Recherches sur la constitution cytoplasmique de l'archéspore et du sac embryonnaire de *Lilium candidum* L., *Botaniste* 48:99—155.
- Guillermont A., 1924, Recherches sur l'évolution du chondriome pendant le développement du sac embryonnaire et des cellules-mères des grains de pollen dans les Liliacées et sur la signification des formations ergastoplasmiques, *Ann. Sc. Nat.*, 10^e sér. 5—6:5—52.
- Jensen W. A., 1962, Botanical histochemistry, Freeman W. H. and Comp., San Francisco and London.
- Jensen W. A., 1963, Cell development during plant embryogenesis, *Brookhaven Symp. Biol.*, 16:179—202.
- Kuran H., 1968, Dry mass of lily megasporocyte and four nucleate embryo sac determined by the interference microscope, *Bull. Soc. Lett. Łódź.* 18 (2):1—3.
- Marciniak K., Kuran H., 1968, Występowanie enzymów hydrolitycznych oznaczanych cytochemicznie w zalążku i woreczku zalążkowym *L. regale*, w druku.
- Mazia D., Brewer P. A., Alfert M., 1953, The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue, *Biol. Bull.* 104:57—67.
- Mikulska E., Rodkiewicz B., 1964, Struktury cytoplazmatyczne megasporocytu i woreczka zalążkowego lilii obserwowane w mikroskopie elektronowym, *Acta Soc. Bot. Pol.*, 33: 619—630.
- Mottier D. M., 1898, Ueber das Verhalten der Kerne bei der Entwicklung des Embryosacks und die Vorgänge bei Befruchtung, *Jahrbüch. wiss. Bot.*, 31: 125—158.
- Orman E., 1912, Recherches sur les différenciations cytoplasmiques (ergastoplasme et chondriosomes) dans les végétaux. I. Le sac embryonnaire des Liliacées, *La Cellule* 28: 365—441.
- Pearse A. G. E., 1962, Histochemistry, Churchill, LTD., London.
- Podźubnaja-Arnol'di V. A., 1964, Obszczaja embriologija pokrytosemennych rastenij, Nauka Moskwa.
- Pritchard H. N., 1964, A cytochemical study of embryo sac development in *Stellaria media*, *Amer. Jour. Bot.* 51: 371—378.

- Rodkiewicz B., Mikulska E., 1963, Electron microscope observations of cytoplasmic changes in developing megasporocyte of *Lilium candidum*, Flora 154: 383—387.
- Rodkiewicz B., Mikulska E., 1965, Electron microscope observations of endoplasmic reticulum in *Lilium* megasporocyte, Flora 155: 341—346.
- Rodkiewicz B., Mikulska E., 1966a, Struktury w cytoplazmie rozwijającego się woreczka zalążkowego obserwowanego w mikroskopie elektronowym, Acta Soc. Bot. Pol. 35: 239—256.
- Rodkiewicz B., Mikulska E., 1966b, Fine structure of the cytoplasm in the lily embryo sac with dividing micropylar nuclei, Flora 156: 510—520.
- Rodkiewicz B., Mikulska E., 1966c, The fine structure of embryo sac of *Lilium regale*, Bull. Soc. Lett. Łódź. 17 (3):1—2.
- Takao A., 1962, Histochemical studies on the formation of some leguminous seeds, Japan. Journ. Bot., 18: 55—72.
- Zinger N. W., 1958, Semja, jego rozwitije i fizjologiczeskije swojstwa, Izdatel'stwo AN SSSR, Moskwa.