

ELŻBIETA KUTA¹ i JOANNA ROJEK²

¹*Zakład Cytologii i Embriologii Roślin*

Uniwersytet Jagielloński

Grodzka 52, 31-044 Kraków

e-mail: kuta@grodzki.phils.uj.edu.pl

²*Zakład Genetyki i Cytologii*

Uniwersytet Gdański

Kładki 24, 80-822 Gdańsk

e-mail: rojek@biotech.univ.gda.pl

BIELMO – TKANKA ODŻYWIAJĄCA ZARODEK II. AUTONOMICZNY ROZWÓJ BIELMA U ROŚLIN OKRYTONASIENNYCH (ANGIOSPERMAE)

WSTĘP

Bielmo (endosperma, endosperm) jest bardzo ważną tkanką roślinną, która dostarcza substancji odżywczych dla rozwijającego się zarodka i dojrzewającego nasienia. U większości rozmnażających się płciowo Angiospermae bielmo powstaje w wyniku podwójnego zapłodnienia z komórki centralnej i prawidłowy rozwój jest uzależniony od właściwej proporcji (2:1) matczynego i ojcowskiego genomu, biorących udział w jego powstaniu. Jakkolwiek, nawet nieznaczne, zakłócenie w tym stosunku ma wpływ na żywotność zarodka. Przypuszcza się, że ten sam gen może dawać różny efekt w zależności od tego czy jest dziedziczony drogą męską czy żeńską (patrz art. ROJEK i KUTA w tym numerze KOSMOSU).

Występowanie autonomicznego bielma (rozwijającego się bez zapłodnienia komórki centralnej) *in vivo* u różnych taksonów (autonomiczne apomikty, nieliczne gatunki rozmnażające się płciowo), u których genom ojcowski w ogóle nie uczestniczy w jego rozwoju, jak również możliwość prawidłowego rozwoju bielma przy innym niż 2:1 stosunku genomów rodzicielskich (np. u roślin z rozwojem megagametofitu wg typu *Oenothera*, *Penea*, *Fritillaria*,

Peperomia; u większości pseudogamicznych apomiktów) wskazują, że w toku ewolucji rośliny wykształciły adaptację do normalnego rozwoju bielma i nasion bez zachowania wymaganego stosunku genomów rodzicielskich (patrz GRIMANELLI i współaut. 2001, ROJEK i KUTA w tym numerze KOSMOSU).

Autonomiczny rozwój bielma można zainicjować w warunkach eksperymentalnych w wyniku zapyleń napromieniowanym pyłkiem, jak również w wyniku kultur *in vitro* niezapłodnionych zalążków.

W ostatnich kilku latach ukazało się wiele prac na temat mutacji *fie*, *mea* i *fis* u *Arabidopsis* (np.: OHAD i współaut. 1996, 1999; GROSSNIKLAUS i współaut. 1998, 2001; GOLDBERG i FISCHER 1999; KIYOSUE i współaut. 1999; LUO i współaut. 1999, 2000; VINKENOOG i współaut. 2000; VINKENOOG i SCOTT 2001). Zmutowane geny są odpowiedzialne za niezależny od zapłodnienia rozwój endospermy i nasienia. Badania te wskazują, że zapłodnienie nie jest konieczne do stymulacji formowania się endospermy nawet we wczesnych etapach rozwoju, jak również, że drogi rozwoju komórki jajowej i komórki centralnej są niezależne,

gdyż mutacja *fie* nie inicjuje embriogenezy. Nadal jednak niewiele wiadomo na temat genetycznych podstaw autonomicznego rozwoju

bielma i partenogenetycznego różnicowania się komórki jajowej.

AUTONOMICZNY ROZWÓJ BIELMA U ROZMNAŻAJĄCYCH SIĘ PŁCIOWO ROŚLIN

AUTONOMICZNY ROZWÓJ BIELMA *IN SITU*

U rozmnażających się płciowo Angiospermae bielmo powstaje w wyniku zapłodnienia komórki centralnej i z reguły jest triploidalne ($3n$). Nieliczne gatunki charakteryzuje autonomiczny rozwój bielma w warunkach *in situ* (Tabela 1). Do takich gatunków należą np. *Anemone ranunculoides* i *A. nemorosa*. W polskich populacjach osobniki rozmnażają się głównie na drodze wegetatywnej przez kłącza. Wykształcane nasiona nie są zdolne do kiełkowania, bowiem nie następuje zapłodnienie komórki centralnej; bielmo rozwija się autonomicznie, co potwierdziła analiza kariologiczna (TRELA 1963a, b; TRELA-SAWICKA 1974). Możliwość autonomicznego rozwoju bielma u *A. nemorosa*), we francuskich populacjach tego gatunku, została opisana również przez BROULANDA (1968). Tylko w nielicznych megagametofitach autonomiczny rozwój bielma następował na drodze normalnych podziałów mitotycznych. Z większą frekwencją występowały zaburzone mitozy (TRELA 1963b), objawiające się głównie zahamowaniem cytokinezy i tworzeniem jąder restytucyjnych. Efektem powyżej opisanych zaburzeń, obserwowanych głównie w centralnej części endospermy, było powstawanie jąder na różnym stopniu ploidalności (od $4n$ do $32n$).

Uzyskane wyniki zostały potwierdzone przez eksperymenty z kastrowanymi i izolowanymi kwiatami, jak również poprzez zapylenia w warunkach kontrolowanych. Obserwowano początkowy rozwój zygotycznego zarodka i autonomicznej endospermy; w późniejszych etapach następowało zahamowanie rozwoju, co prowadziło do wytworzenia nasion niezdolnych do kiełkowania.

Defekt w rozwoju nasion osobników polskich populacji *A. nemorosa* i *A. ranunculoides* wydaje się być efektem samoniezgodości; łagiewki pyłkowe nie dorastają do komórki centralnej (TRELA-SAWICKA 1974). Osobniki powstałe drogą powielania przez kłącza stanowią klon składający się z roślin identycznych genetycznie. Zapylenia w obrębie klonu prowadziły do zaburzeń w rozwoju nasion. Nato-

miast w wyniku krzyżowań między klonami powstawały żywotne nasiona i siewki.

Autonomiczny rozwój bielma udało się również uzyskać w warunkach *in situ* u orzecha włoskiego (*Juglans regia*) (TADEO i współaut. 1994). Głównym celem badań było śledzenie rozwoju woreczka zalążkowego i wpływu endogennych giberelin na zapyłone i niezapyłone zalążnie tej rośliny. Uzyskane wyniki wskazują na to, że kolejność zapylenia/zapłodnienia moduluje poziom fitohormonów. Początkowo, tuż po zapyleniu, następuje obniżenie poziomu hormonów, a następnie, krótko po rozpoczęciu embriogenezy, poziom hormonów podnosi się i utrzymuje na mniej więcej stałym poziomie. W niezapyłonych zalążniach najniższy notowany poziom giberelin pokrywał się z momentem zahamowania wzrostu zalążni, „odpadania” niezapyłonych zalążków (100%) oraz przyspieszeniem celularyzacji rozwijającej się autonomicznie endospermy. Zastosowanie egzogennych giberelin nie niwelowało efektu hamowania wzrostu i „odpadania” zalążków.

Ostatnio, badania embriologiczne niezapyłonych zalążków pomidora (*Lycopersicon esculentum*) wykazały możliwość indukcji autonomicznego bielma u tego gatunku *in situ* (ADAMOWICZ i współaut. 2000). W jednym, na pięć badanych genotypów, w pojedynczych zalążkach obserwowano rozwój wielojądrowej struktury przypominającej endospermę, która wypełniała wnętrze woreczka zalążkowego.

Podobnie, w badaniach nad komercyjnym kultywarem *Viola x wittrockiana* (bratek szwajcarski), w niezapłodnionych megagametofitach pąków o długości 20 mm i pąków półotwartych, obserwowano wielojądrowe struktury, przypominające endospermę jądrową, towarzyszące niekiedy aparatowi jajowemu, które występowały odpowiednio z frekwencją 2,3% i 4,8% (OPOKA 2001). Interpretacja takich woreczków zalążkowych jest bardzo trudna bowiem nie można ustalić czy jest to efekt podziału jądra wtórnego bądź jąder biegunowych, czy też wynik nadliczbowych mitoz prowadzących do powstania wielojądrowych, nienormalnych, dojrzałych gametofitów.

Tabela 1. Autonomiczne bielmo u rozmnażających się płciowo przedstawicieli Angiospermae.

Takson	Literatura
<i>In situ</i>	
<i>Anemone nemorosa</i>	TRELA (1963a, b); BROULAND (1968)
<i>Anemone ranunculoides</i>	TRELA-SAWICKA (1974)
<i>Juglans regia</i>	TADEO i współaut. (1994)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	ADAMOWICZ i współaut. (2000)
<i>Viola x wittrockiana</i>	OPOKA (2001)
<i>Zea mays</i>	LAIKOVA (1976)
<i>In situ</i> po zapyleniu napromieniowanym pyłkiem	
<i>Actinidia deliciosa</i>	MUSIAŁ i PRZYWARA (1998, 1999b)
<i>Cucumis sativus</i>	LE DEUFF i SAUTON (1994); FARIS i NIEMIROWICZ-SZCZYTT (1999)
<i>Malus</i> spp.	JAMES i współaut. (1985); NICOLL i współaut. (1987); ZHANG i LESPINASSE (1991)
<i>Nicotiana</i> sp.	MUSIAŁ i PRZYWARA (1999a)
<i>Prunus domestica</i>	PEIXE i współaut. (2000)
<i>Theobroma cacao</i>	FALQUE i współaut. (1994)
<i>In vitro</i>	
<i>Allium cepa</i>	MUSIAŁ i współaut. (2001)
<i>Brassica napus</i>	CHMIELOWIEC i współaut. (1997); ROJEK 2000; ROJEK i współaut. (2000)
<i>Gossypium hirsutum</i>	JENSEN i współaut. (1977)
<i>Helianthus annuus</i>	YANG i współaut. (1986)
<i>Helleborus niger</i>	MÓL i współaut. (1995)
<i>Hordeum vulgare</i>	HUANG i współaut. (1982)
<i>Lupinus luteus</i>	MÓL i współaut. (1995)
<i>Melandrium album</i>	MÓL 1992; MÓL i współaut. (1995)
<i>Oryza sativa</i>	ZHOU i YANG (1981)
<i>Viola odorata</i>	WIJOWSKA i współaut. (1999a, b)
<i>Viola riviniana</i>	WIJOWSKA i KUTA (2000)
<i>Viola silvestris</i>	WIJOWSKA i KUTA (2000)
<i>Viola x wittrockiana</i>	STĘPIEŃ-WIJOWSKA (2002)

Autonomiczny rozwój bielma *in situ* u roślin rozmnażających się płciowo jest zjawiskiem rzadkim i wymaga bardziej wnikliwych badań porównawczych rozwoju endospermy *in situ* i *in vitro* u danego genotypu czy gatunku. Nie można wykluczyć, że indukcja autonomicznego rozwoju bielma ma związek z pre-

dyspozycjami wielu roślin okrytonasiennych do apomiksji, która w świetle obecnych danych wydaje się być uwarunkowana ekspresją pojedynczego (-cych) genu (-ów), zależną od czasu i stadium rozwojowego (KOLTUNOW i współaut. 1995, SAVIDAN 2001).

INDUKCJA AUTONOMICZNEGO ROZWOJU BIELMA W WARUNKACH EKSPERYMENTALNYCH

Autonomiczny rozwój endospermy można zaindukować w warunkach eksperymentalnych przez zapylenia z użyciem napromienionego pyłku oraz w kulturach *in vitro* niezapylnych zalążków i zalążni (Tabela 1).

Autonomiczny rozwój bielma po zapyleniach *in situ* napromienionym pyłkiem

Zapylenia napromienionym pyłkiem (stosuje się głównie promieniowanie gamma) są szeroko stosowaną techniką w indukcji *in situ* haploidalnych roślin. Ta metoda została między innymi zastosowana u niektórych roślin użytkowych (np. u jabłoni, ogórka, kiwi, gruszy, róży, melona), aczkolwiek procent uzyskiwanych haploidów był bardzo niski. Dopiero zastosowanie kultury *in vitro* zapylnych napromienionym pyłkiem zalążków, nasion lub zarodków znacznie polepszyło uzyskiwane wyniki.

Pomimo, że napromienionego pyłku używano od wielu lat (po raz pierwszy użyty w 1922 r. przez Blakeslee i współpracowników), niewiele jest badań nad zapłodnieniem i wczesnymi etapami embriogenezy po zapyleniu napromienionym pyłkiem. Takie badania embriologiczne zostały przeprowadzone nad *Lilium*, *Melandrium*, *Tradescantia*, *Theobroma cacao*, *Actinidia deliciosa*, *Pyrus*, *Prunus*, *Cucumis* (patrz MUSIAŁ i PRZYWARA 1998, FARIS i NIEMIROWICZ-SZCZYTT 1999, PEIXE i współaut. 2000).

Autonomiczny rozwój bielma udało się zaindukować, w wyniku zapyceń napromienionym pyłkiem, u kilku taksonów ważnych ekonomicznie: ogórka, tytoniu, kiwi, jabłoni, śliwy, i kakaowca (Tabela 1).

Badania prowadzone nad zapyleniami napromienionym pyłkiem wskazują na kilka efektów tego procesu: (i) napromienianie zaburza podwójne zapłodnienie, co jest związane głównie z wpływem promieniowania na wzrost łagiewki pyłkowej i na żywotność pyłku; (ii) rozwój zarodka i endospermy jest zależny od dawki napromieniania; (iii) z reguły, przy stosowaniu wyższych dawek napromieniania (200 i > Gy) rozwój zarodka i bielma jest opóźniony w stosunku do materiału kontrolnego i do materiału uzyskanego po użyciu niższych dawek napromieniania (<100 Gy), chociaż efekt zastosowanej dawki jest zależny od gatunku. Najczęściej, przy wyż-

szych dawkach promieniowania następuje znaczne przyspieszenie degeneracji bielma i zarodków, jak również ich rozwój odbiega od normalnego. Mogą oczywiście być wyjątki i tak np. u *Actinidia deliciosa*, chociaż wyższe dawki napromieniania (700 i 900 Gy) drastycznie obniżały liczbę nasion w zalążniach, to przy większej dawce napromieniania (900Gy) procent nasion zawierających zarówno zarodek, jak i endospermę był wyższy niż przy dawce 700 Gy (Ryc. 1). To zjawisko może być wyja-



Fig. 1. Autonomiczne komórkowe bielmo (ab) i partogenetyczny zarodek (z) u *Actinidia*, 72 dni po zapyleniu napromienionym pyłkiem o dawce promieniowania 9 kG; pow. 90 × (zdjęcie udostępnione przez dr. K. Musiał i prof. L. Przywarę).

śnione przez tzw. efekt Hertwiga opisywany przez kilku badaczy (patrz MUSIAŁ i PRZYWARA 1998). Natomiast u *Nicotiana* nie obserwowano wyraźnego wpływu dawki napromieniania; efekt zapylenia napromienionym pyłkiem był podobny we wszystkich użytych

krzyżówkach, a różnice w indukcji autonomicznego rozwoju endospermy i partenogenezy pod wpływem zastosowanych dawek były znikome (MUSIAŁ i PRZYWARA 1999a); (iv) opóźniony rozwój bielma przejawia się, w przypadku bielma jądrowego, brakiem zakładania się ścian komórkowych; bielmo kontrolne po określonym, dla danego gatunku, czasie po zapyleniu osiąga stadium komórkowe, bielmo powstałe po zastosowaniu pyłku napromieniowanego pozostaje jądrowe (PEIXE i współaut. 2000); (v) w zależności od wysokości dawki napromieniowania, uzyskuje się nasiona: normalne, puste, z obecnością wyłącznie endospermy, wyłącznie zarodka, bądź z zarodkiem i bielmem; (vi) z reguły autonomiczne bielmo zawiera mniej substancji zapasowych w porównaniu z bielmem kontrolnym; ilość skrobi i lipidów w diploidalnej endospermie komórkowej jest porównywalna z ilością tych substancji w komórce centralnej; (vii) status bielma (ploidalność) ustala się na podstawie analizy kariologicznej, cytometrii przepływowej bądź metod analizy morfometrycznej; (viii) jądra autonomicznej endospermy mogą wykazywać zróżnicowanie kariologiczne (powstają jądra poliploidalne na skutek zaburzeń podziałów mitotycznych, bądź procesów endoreplikacyjnych), co obserwowano u jabłoni (NICOLL i współaut. 1987) lub nie wykazują takiej zmienności np. u kiwi (MUSIAŁ i PRZYWARA 1999b); synchronizacja podziałów jąder endospermy może być wyraźnie zakłócona.

Wyniki te mają duże znaczenie, bowiem uzyskana na tej drodze endosperma może dawać potencjalne możliwości regeneracji homozygotycznych, diploidalnych roślin, jak również dla badań genetycznych i programów rozrodczych.

Eksperymenty z napromieniowanym pyłkiem mogą rzucić pewne światło na zjawisko imprintingu genomowego charakterystycznego dla rozwoju bielma u rozmnażających się płciowo Angiospermae. W wyniku zapylenia napromieniowanym pyłkiem można uzyskać potomstwo, które jest dokładną repliką rośliny matczynej. Podobnie jak w przypadku autonomicznie rozwijającej się endospermy u apomiktów i niektórych taksonów rozmnażających się płciowo, prawidłowy stosunek genomów rodzicielskich 2 (mateczne):1 (ojcowski), biorących udział w powstawaniu bielma po zapyleniu napromieniowanym pyłkiem, jest zakłócony; nie uczestniczy w ogóle genom ojcowski.

Autonomiczny rozwój bielma w kulturach niezapylnych zalążków i zalążni

Kultury *in vitro* niezapylnych zalążków i zalążni są obecnie, obok androgenozy, jedną z najważniejszych metod uzyskiwania haploidów, organizmów modelowych do wielu badań embriologicznych i genetycznych. W wyniku indukcji gynogenezy *in vitro* dochodzi do partenogenetycznego rozwoju komórki jajowej i/lub rozwoju bez zapłodnienia innej komórki woreczka zalążkowego bądź bezpośrednio embriogenezy z megaspor (MÓL 1999). Sporadycznie może również dochodzić do stymulacji podziałów jądra wtórnego komórki centralnej lub jąder biegunowych, co prowadzi do rozwoju autonomicznej endospermy (MÓL 1999). Indukcję autonomicznego bielma uzyskano w kulturze niezapłodnionych zalążków bądź zalążni kilkunastu taksonów (Tabela 1).

Czynniki wpływające na indukcję rozwoju autonomicznego bielma w kulturach in vitro. Podobnie jak w przypadku gynogenezy, wiele czynników może wpływać na indukcję podziałów komórki centralnej. Występowanie autonomicznego rozwoju bielma w zalążkach hodowanych na pożywkach indukujących gynonegezę sugeruje podobieństwo działających czynników na obydwie procesy.

Do najważniejszych czynników wpływających na efektywność kultur niezapylnych zalążków i zalążni należą: genotyp rośliny donorowej, skład pożywki, stadium rozwojowe woreczka zalążkowego, warunki kultury, rodzaj eksplantatu, wiek oraz warunki wzrostu rośliny matecznej (patrz MUSIAŁ i PRZYWARA 2001). Wpływ poszczególnych czynników na indukcję gynogenezy został szeroko omówiony w kilku pracach przeglądowych (YANG i ZHOU 1982, BOHANEK 1994, MUKHAMBE-TZHANOV 1997, MÓL 1999, MUSIAŁ i PRZYWARA 2001). W niniejszej pracy przedstawiony jest wpływ wyżej wymienionych czynników na indukcję rozwoju autonomicznego bielma.

Istnieje wyraźna zależność pomiędzy genotypem rośliny donorowej a zdolnością do rozwoju *in vitro*. U *Viola odorata*, w kulturze niezapylnych zalążków, zarówno frekwencja powiększonych zalążków, jak i indukcja autonomicznej endospermy zależała w głównej mierze od genotypu rośliny matecznej (WIJOWSKA i współaut. 1999a, b). W genotypach G6 i G10 ponad 95% zalążków powiększało się, podczas gdy w genotypie G9 tylko 47%. Najwyższą frekwencję indukcji endospermy uzyskano w ge-

notypie G9 (12,3%), natomiast najniższą w genotypie G6 (5,5%). U rzepaku dwa, spośród trzech testowanych genotypów, okazały się podatne na indukcję autonomicznego rozwoju bielma w warunkach kultur *in vitro* niezapłodnionych słupków (CHMIELOWIEC i współaut. 1997, ROJEK 2000, ROJEK i współaut. 2000).

Podobna zależność występuje w przypadku rodzaju eksplantatu. Dla jednych roślin najlepsze rezultaty osiągnano stosując kulturę niezapylnych zalążków, dla innych wydajniejsza była kultura zalążni czy nawet całych pąków kwiatowych. U rzepaku najlepsza okazała się kultura słupków z zachowanymi działkami kielicha i fragmentem szypułki kwiatowej (CHMIELOWIEC i współaut. 1997, ROJEK 2000, ROJEK i współaut. 2000), całych zalążni u ryżu (ZHOU i YANG 1982), *Lupinus luteus*, *Helleborus niger* i *Melandrium album* (MÓL i współaut. 1995) i u przedstawicieli rodzaju *Viola* (WIJOWSKA i KUTA 2000). Aczkolwiek dla *Viola odorata* dobre rezultaty uzyskano również stosując kulturę niezapłodnionych zalążków. Natomiast w przypadku *V. silvestris*, *V. riviniana* i *Viola x wittrockiana* indukcja autonomicznego rozwoju endospermy wystąpiła jedynie przy wykorzystaniu jako eksplantatu niezapylnych zalążni; nie udało się utrzymać w kulturze izolowanych, niezapłodnionych zalążków (WIJOWSKA i współaut. 1999a, b; WIJOWSKA i KUTA 2000; STĘPIEŃ-WIJOWSKA 2002), a u *H. niger* obok zalążni zadowalające wyniki uzyskano w kulturze zalążków przymocowanych do placenty (MÓL i współaut. 1995).

Ważnym czynnikiem dla wydajnej kultury żeńskich gametofitów jest stadium rozwojowe woreczka zalążkowego. Z reguły im woreczek jest lepiej wykształcony tym większe prawdopodobieństwo wystąpienia haploidalnej partenogenezy. Wydaje się, że taka sama zależność istnieje dla indukcji rozwoju autonomicznej endospermy. W momencie inokulacji u *Viola odorata* (WIJOWSKA i współaut. 1999a, b; WIJOWSKA i KUTA 2000; STĘPIEŃ-WIJOWSKA 2002), *Brassica napus* (CHMIELOWIEC i współaut. 1997, ROJEK 2000, ROJEK i współaut. 2000), *Lupinus luteus* i *Helleborus niger* (MÓL i współaut. 1995), *Helianthus annuus* (YANG i współaut. 1986), woreczek zalążkowy był w stadium 8-jądrowym. U *Melandrium album*, w momencie rozpoczęcia kultury, eksplantaty zawierały megagametofity w młodszych stadiach rozwojowych (1- do 4- jądrowe woreczki zalążkowe), które osiągały dojrzałość w toku trwania kultury. Aczkolwiek w kulturze

zalążków przymocowanych do placenty, 1- do 4-jądrowe woreczki zalążkowe tego gatunku rozwijały się w nietypowe gametofity z nadliczbowymi jądrami (MÓL 1992, MÓL i współaut. 1995), które po dalszych podziałach tworzyły strukturę przypominającą wielojądrowe bielmo. W przypadku *Hordeum vulgare* hodowane *in vitro* zalążnie zawierały wprawdzie gametofity w różnych stadiach rozwojowych (od 1-jądrowego woreczka zalążkowego do stadium dojrzałego megagametofitu), to jednak najwyższą frekwencję indukcji haploidalnych zarodków i autonomicznej endospermy odnotowano, kiedy zalążki w momencie inokulacji zawierały dojrzałe, 8-jądrowe megagametofity (HUANG i współaut. 1982, CASTILLO i CISTUE 1993). U *Oryza sativa* obserwowano rozwój haploidalnych roślin nawet bezpośrednio z megaspori, jednak kultura starszych zalążni dała w efekcie zarówno rozwój haploidów jak i autonomicznej endospermy (patrz MUSIAŁ i PRZYWARA 2001).

Na wyniki kultury *in vitro* niewątpliwie wpływ ma również rodzaj pożywki oraz stężenie substancji wzrostowych i cukrów. Początkowo (lata 50.) większość eksperymentów prowadzono na pożywkach Nitscha; obecnie najczęściej używa się pożywek: MS, Millera, i N6 (patrz MUSIAŁ i PRZYWARA 2001). Wiele doświadczeń wskazuje na to, że skład pożywki może mieć decydujące znaczenie dla drogi, jaką będzie przebiegać rozwój niezapłodnionego gametofitu żeńskiego. U rzepaku, z kilkunastu zastosowanych pożywek, na pięciu nastąpiła indukcja autonomicznego rozwoju endospermy: MS (bez dodatku regulatorów wzrostu), MS + 2 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA, MS + 2 mg/l BAP + 2 mg/l 2,4-D oraz po tzw. szokach auksynowych, gdzie na pożywce MS z wysokimi dawkami 2,4-D (20 lub 40 mg/l) hodowano materiał przez 1 godz., a następnie przenoszono na czystą pożywkę MS (CHMIELOWIEC i współaut. 1997, ROJEK 2000, ROJEK i współaut. 2000). W przypadku gatunków z rodzaju *Viola*, autonomiczny rozwój endospermy wystąpił u *V. riviniana*, *V. silvestris* i *Viola x wittrockiana* (WIJOWSKA i KUTA 2002, STĘPIEŃ-WIJOWSKA 2002) na pożywce MS zawierającej niską koncentrację 2,4-D (0,01, 0,1 i 1 mg/l); z kolei dla *Viola odorata* rodzaj pożywki nie był istotnym czynnikiem dla indukcji rozwoju endospermy; rozwój nastąpił na wszystkich zastosowanych w kulturze pożywkach (WIJOWSKA i współaut. 1999b, WIJOWSKA i KUTA 2000).

W większości przypadków obecność egzogennych hormonów jest niezbędna do indukcji rozwoju autonomicznego bielma, aczkolwiek ich wysokie stężenie może stymulować nadmierny rozrost tkanek somatycznych, przy jednoczesnym zahamowaniu rozwoju struktur wewnątrz woreczka zalążkowego (YANG i ZHOU 1982, MUKHAMBETZHANOV 1997). Badania nad *Brassica napus* wykazały, że rozwój autonomicznej endospermy jest także możliwy bez użycia egzogennych fitohormonów. Na pożywce podstawowej MS wzbogaconej tylko wyższym stężeniem sacharozy (6%), frekwencja indukcji autonomicznego rozwoju endospermy była stosunkowo wysoka (ROJEK i współaut. 2000). U *Helleborus niger* obecność wody bez dodatku fitohormonów i składników odżywczych oraz podwyższenie temperatury, indukowało autonomiczny rozwój bielma (MÓL i współaut. 1995). Warto zaznaczyć, że w przypadku gynogenezy *in vitro*, rozwój gynogenicznych zarodków na pożywce bez dodatku egzogennych fitohormonów notowano jak dotąd tylko w kulturach niezapylonych zalążni kukurydzy (Alatorceva i Tyrnov 1994, za BHOJWANI i THOMAS 2001) i u *Allium cepa* (CAMPION i współaut. 1995).

Warunki w jakich prowadzi się kultury niezapylonych zalążni i zalążków mają również duże znaczenie. Można stosować pożywki płynne lub stałe, hodować eksplantaty na świetle lub w ciemności i przy różnej temperaturze. Izolowane zalążnie i zalążki z reguły hoduje się w temperaturze 22–26°C, ale czasami niższe lub wyższe temperatury są optymalne dla kultury (MUKHAMBETZHANOV 1997). MÓL i współautorzy (1995) podają, że obok hormonów temperatura jest istotnym czynnikiem indukującym podziały w niezapłodnionych komórkach centralnych. U *Helleborus niger* temperatura była prawdopodobnie najważniejszym czynnikiem spontanicznego formowania się endospermy w półnaturalnych warunkach, gdzie kwiaty były inkubowane w wodzie bez dodatku fitohormonów, ale przy znacznie podwyższonej temperaturze (27°C) w porównaniu z warunkami *in planta* (poniżej 10°C).

Dotychczas nieliczne badania dotyczyły określenia wpływu wieku rośliny donorowej na procesy zachodzące w kulturach *in vitro*. W przypadku gynogenezy u *Gerbera jamesonii* wykazano, że wiek jest bardzo ważnym czynnikiem wpływającym zarówno na wydajność formowania kalusa jak i na jego zdolności morfo-

genetyczne (patrz MUSIAŁ i PRZYWARA 2001). W przypadku *Viola odorata* zalążki z pąków kwiatowych i kwiatów serii jesiennej były bardziej podatne na indukcję autonomicznego rozwoju bielma (12,5% i 13,7%, odpowiednio) niż ze stadium otwartego kwiatu i kwiatów pochodzących z serii wiosennej (odpowiednio 8,3% i 4,9%).

Embriologia autonomicznego bielma uzyskanego in vitro. Autonomiczny rozwój bielma rozpoczyna się zwykle od podziałów jądra wtórnego (MÓL i współaut. 1995), ale może być również rezultatem podziałów jąder biegunowych, które nie uległy fuzji. Kolejną możliwą drogą jest powstanie nietypowego cenocytowego woreczka zalążkowego z dużą liczbą jąder, z którego po cytokinezie może powstać tkanka przypominająca bielmo (MÓL 1999).

Z reguły moment pierwszych podziałów jąder endospermy jest trudny do zaobserwowania, nie można więc bezpośrednio ustalić czy autonomiczna endosperma powstała z dwóch osobno dzielących się jąder biegunowych (lub jednego) czy też w wyniku podziału wtórnego jądra komórki centralnej. Dotychczas bardzo nieliczne są dane na temat statusu kariologicznego autonomicznego bielma zaindukowanego w warunkach *in vitro*. Aby ustalić pochodzenie autonomicznej endospermy wykorzystuje się więc drogę pośrednią, polegającą na porównaniu struktury i wielkości jąder endospermy powstałej w wyniku kultury, z endospermą kontrolną oraz z jądrami biegunowymi i pierwotnym jądrem endospermy.

W kulturach niezapylonych zalążków *Viola odorata* nie obserwowano wczesnych etapów rozwoju bielma, nie udało się również ustalić liczby chromosomów. Istnieje jednak kilka faktów wskazujących na powstanie bielma w wyniku podziałów jąder biegunowych (WIJOWSKA i współaut. 1999b). W kontrolnych kwiatach, po wolnym zapyleniu, znajdowano dojrzałe, 8-jądrowe megagametofity z obecnością 2 jąder biegunowych w komórce centralnej. Nawet w zapłodnionych woreczkach zalążkowych, gdzie komórka plemnikowa widoczna była w komórce jajowej, jądra biegunowe nadal nie ulegały fuzji. W niezapylonych kwiatach, pozostawionych w izolacji przez trzy tygodnie, znajdowano wyłącznie komórkę centralną z 2 jądrami biegunowymi. Podobnie w materiale hodowanym *in vitro*, po czterech dniach kultury, w niezapłodnionych worecz-

kach zalążkowych nadal stwierdzano obecność w komórce centralnej jąder biegunowych obok aparatu jajowego. Powyższe obserwacje wskazują raczej na pochodzenie autonomicznej endospermy u tego taksonu z jąder biegunowych (lub jednego jądra biegunowego) aniżeli jądra wtórne. To oznaczałoby, że autonomicznie rozwijająca się endosperma jest haploidalna. Autorzy (WIJOWSKA i współaut. 1999b) nie wykluczają jednak możliwości fuzji jąder biegunowych w toku trwania kultury.

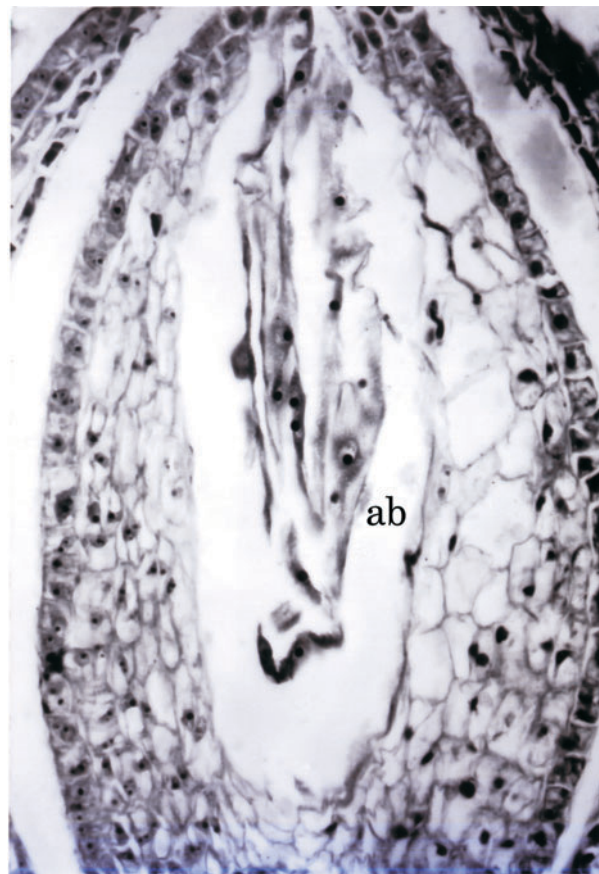
U *Lupinus luteus*, *Helleborus niger* i *Melandrium album* w większości pierwotnych eksplantatów występowały jądra biegunowe, ale w trakcie kultury, w licznych zalążkach, obserwowano również jądro wtórne (MÓL i współaut. 1995), co sugeruje rozwój autonomicznego bielma w wyniku podziałów jąder biegunowych lub jądra wtórne.

Rozwój autonomicznej endospermy z wtórnego jądra komórki centralnej notowano także w kulturach niezapylonych zalążków *Gossypium hirsutum* (JENSEN i współaut. 1977), zaś z jąder biegunowych u ryżu i bawełny (ZHOU i YANG 1981, HUANG i współaut. 1982).

Endosperma indukowana *in vitro* z reguły składa się z kilku do kilkudziesięciu jąder. U *Viola odorata*, w zalążkach po 4–7 dniach kultury liczba jąder autonomicznej endospermy wahała się od 10 do 50 (Ryc. 2), zaś u rzepaku między 3 a 14 dniem kultury od 2–20, a u *Allium cepa* do trzeciego tygodnia kultury od 4 do 30. Wielojądrowe autonomiczne bielmo obserwowano u *Helleborus niger*; niektóre zalążki zawierały 260–420 jąder. Jednak w żadnym z zalążków nie zauważono celularyzacji endospermy. Częściową celularyzację bielma u tego gatunku obserwowano jedynie w półnaturalnych warunkach hodowlanych, a także sporadycznie (w jednym zalążku) w warunkach *in vitro* u *Melandrium album* (MÓL 1992). Przedwczesną celularyzację autonomicznej endospermy uzyskał JENSEN i współautorzy (1977) po zastosowaniu egzogennej hormonów (IAA i GA₃).

Do niedawna twierdzono, że w kulturze niezapylonych zalążków i zalążni, w jednym worczku zalążkowym, rozwijała się tylko autonomiczna endosperma lub wyłącznie haploidalny zarodek (MÓL 1999). Ostatnie badania nad *Allium cepa* udowodniły, że zarówno zarodek, jak i endosperma mogą rozwijać się w jednym zalążku w warunkach kultury *in vitro* niezapłodnionych zalążków (MUSIAŁ i współaut.

2001). Rozwój haploidalnego zarodka i autonomicznej endospermy w obrębie tego samego zalążka opisywano także w przypadku eksperymentów z zapylaniem *in situ* napromieniowanym pyłkiem u *Actinidia deliciosa* (MUSIAŁ i PRZYWARA 1998, 1999a), u przedstawicieli rodzaju *Nicotiana* (MUSIAŁ i PRZYWARA 1999b) i u *Prunus domestica* (PEIXE i współaut. 2000).



Ryc. 2. Autonomiczne bielmo jądrowe (ab) zaindukowane w niezapylonych, izolowanych zalążkach *Viola odorata* po 6 dniach kultury na pożywce MS+0,1mg/l 2,4-D; pow. 400× (zdjęcie udostępnione przez dr M. Stępień-Wijowską).

Zakłócenia w początkowej fazie rozwoju cenotycznego bielma w kulturach *in vitro* polegające na nietypowym rozmieszczeniu jąder w cytoplazmie wypełniającej całe wnętrze worczka zalążkowego, zahamowaniu procesu celularyzacji oraz wyraźnym opóźnieniu w rozwoju autonomicznego bielma w porównaniu z bielmem kontrolnym, mogą wynikać ze zmiany ekspresji genów odpowiedzialnych za cykl

komórkowy, tworzenie się radialnego systemu mikrotubul i cytokinę. Wiadomo bowiem, że w kulturach *in vitro* tkanek roślinnych zmiany poziomu metylacji cytozyny wpływają na ekspresję genów; geny, które ulegają ekspresji mają obniżoną metylację (patrz OLSZEWSKA i współaut. 1999). Nie można więc wykluczyć, że w warunkach kultury *in vitro* niezapłodnionych zalążków i zalążni następuje zmiana ekspresji genów (zahamowanie ekspresji genów) blokujących podziały jądra wtórnego bądź

jąder biegunowych przed zapłodnieniem, ale być może jest to jedynie wpływ regulatorów wzrostu na indukcję podziałów mitotycznych w komórce centralnej. Hipotezy te wymagają dalszych badań na poziomie molekularnym.

Autonomiczna endosperma zaindukowana w ściśle zdefiniowanych warunkach eksperymentalnych może okazać się układem modelowym do badania mechanizmów różnicowania się tej tkanki; może również rzucić światło na rolę udziału genomu ojcowskiego na rozwój bielma.

AUTONOMICZNY ROZWÓJ BIELMA U ROŚLIN APOMIKTYCZNYCH

Termin apomiksja oznacza bezpłciowy rozwój roślin, w którym ominięte są dwa etapy charakterystyczne dla rozmnażania płciowego: mejoza (częściowo lub całkowicie) oraz zapłodnienie komórki jajowej. Zarodek rozwija się na drodze partonogenezy zaś bielmo autonomicznie (u apomiktów autonomicznych) lub po zapłodnieniu komórki centralnej (apomikty pseudogamiczne). Początkowo termin ten miał bardzo szeroki zakres i obejmował wszystkie typy rozmnażania bezpłciowego, łącznie z rozmnażaniem wegetatywnym, w których nowy organizm powstawał bez połączenia się gamet (syngamii). Obecnie apomiksja zawężona jest do agamospermi, czyli rozmnażania przez nasiona; zarodek powstaje bez procesu zapłodnienia (patrz NOGLER 1984; CZAPIK 1991, 1997, 1999, 2000a, b).

Apomiksja może być uważana za rozwojową odmianę płciowej drogi rozmnażania, w której określone etapy zostały skrócone (KOLTUNOW 1993). Przy takim założeniu, oba typy rozmnażania powinny mieć wiele wspólnych składników regulatorowych. Jest wysoce prawdopodobne, że geny kontrolujące apomiksję, odgrywają również kluczową rolę w rozmnażaniu płciowym. Zatem genetyczna inżynieria apomiksji będzie wymagała zrozumienia genetycznych podstaw i molekularnych mechanizmów kontrolujących rozmnażanie płciowe. Niestety, jak dotąd, problemy te są bardzo słabo poznane (patrz GROSSNIKLAUS 2001).

Potomstwo powstałe w wyniku agamospermi jest matroklinalne, co oznacza, że fenotypowo jest podobne do organizmu matecznego. Jest to zatem naturalna droga klonowania roślin przez nasiona. Jednak należy pamiętać o możliwości powstawania mieszańców typu

B3, gdy niezredukowana komórka jajowa może być zapłodniona przez zredukowany plemnik.

Należy podkreślić, że bielmo wykształca się u wszystkich badanych do tej pory apomiktów. Jest to zjawisko charakterystyczne zarówno dla apomiktów gametofitowych, jak i sporofitowych. U tych ostatnich rozwój zarodka przybyszowego jest zależny od obecności bielma powstałego na drodze płciowej (patrz GROSSNIKLAUS 2001).

Ogólnie, apomiksja jest szeroko rozprzestrzeniona wśród roślin okrytonasiennych i uznaje się, że ewoluowała niezależnie w kilku taksonach z rozmażających się płciowo przodków. Szacuje się, że apomiksja występuje u 300–400 taksonów (podawany zakres liczby taksonów apomiktycznych jest dosyć szeroki, co wynika z różnego podejścia autorów do rangi jaką nadaje się mikrogatunkom rozmnażającym się bezpłciowo) należących do ok. 40 rodzin. Większość taksonów apomiktycznych (75%) należy do 3 rodzin: Asteraceae, Poaceae i Rosaceae. Występowanie apomiksji i jej form nie jest przypadkowe. Diplosporia jest powszechna wśród Asteraceae, a mniej częsta u pozostałych dwóch rodzin. Natomiast aposporia występuje z największą frekwencją u Rosaceae i Poaceae, zaś rzadko u Asteraceae. Autonomiczna apomiksja wydaje się być ograniczona głównie do Asteraceae; u dwóch pozostałych rodzin występuje sporadycznie (patrz NOGLER 1984, GROSSNIKLAUS 2001, GRIMANELLI i współaut. 2001).

We florze Polski, spośród 2620 opisanych taksonów (MIREK i współaut. 1995), u 63 (ok. 2,5%) należących do 3 wyżej wymienionych rodzin występuje rozwój na drodze agamospermi, bądź stwierdzono u nich występowanie

określonych procesów apomiktycznych (CZAPIK i KOŚCIŃSKA-PAJĄK 2000).

Najnowsze osiągnięcia i trendy w badaniach nad apomiksą dotyczące głównie genetycznych podstaw i molekularnych mechanizmów, jak również perspektywy badań przedstawiają artykuły przeglądowe zebrane w książce pt. „The flowering apomixis: from mechanisms to genetic engineering” wydanej w 2001 r. pod zbiorową redakcją Y. Savidana, J.G. Carmana, T. Dresselhaus.

U zdecydowanej mniejszości apomiktów, rozwój bielma jest autonomiczny, czyli nie jest konieczne zapłodnienie komórki centralnej i tym samym bielmo powstaje bez udziału genomu ojcowskiego. Tak więc przewidywany stosunek genomów rodzicielskich w bielmie u tych form powinien wynosić 4 (mateczne):0 (ojcowskie) przy założeniu, że bielmo rozwija się z jądra wtórnego powstałego po fuzji jąder biegunowych, bądź 2:0 kiedy bielmo powstaje na skutek podziałów pojedynczych jąder biegunowych.

Chociaż pyłek jest zbędny u autonomicznych apomiktów, to jednak rzadko kwiaty są męskosterylne. Są natomiast przypadki form np. w rodzaju *Alchemilla*, u których pyłek w ogóle nie jest wykształcony (IZMAŁOW 1986). Przykładem rośliny niezależnionej od zapyleńia jest rozdzielnopłciowy gatunek *Antennaria alpina* s.l., w obrębie którego wyróżniono setki taksonów znanych tylko z żeńskich okazów (patrz NOGLER 1984).

Bielmo autonomicznych apomiktów składa się z jąder o różnym stopniu ploidalności. Na podstawie badań embriologicznych połączonych ze szczegółową analizą kariologiczną bielma autonomicznych apomiktów z rodzin Asteraceae (*Taraxacum* — MAŁECKA 1967, 1973, 1982; *Hieracium* — SKAWIŃSKA 1962, SKALIŃSKA i KUBIEŃ 1972, SKALIŃSKA 1973, POGAN i WCISŁO 1995, *Chondrilla* — KOŚCIŃSKA-PAJĄK 1996) i Rosaceae (*Alchemilla* —

IZMAŁOW 1986, 1994) wynika, że u badanych taksonów autonomiczne bielmo powstaje w wyniku podziałów: (i) wtórnego jądra będącego efektem fuzji 2 jąder biegunowych o niezredukowanej liczbie chromosomów; (ii) pojedynczych, niezredukowanych jąder biegunowych; (iii) wtórnego jądra bądź jąder biegunowych.

W toku rozwoju autonomicznego bielma dochodzi do zróżnicowania kariologicznego tej tkanki (powstają jądra o aneuploidalnej i poliploidalnej liczbie chromosomów), u podstaw którego leżą zakłócenia w przebiegu mitozy (powstawanie mostów anafazowych, zlewianie się płytek metafazowych, powstawanie jąder restytucyjnych) oraz procesy endoreplikacyjne (endomitoza, endoreduplikacja), co świadczy o tym, że te same mechanizmy są odpowiedzialne za zróżnicowanie bielma autonomicznego jak i powstałego w wyniku zapłodnienia komórki centralnej (patrz art. ROJEK i KUTA w tym numerze KOSMOSU).

Występowanie autonomicznych apomiktów nasuwa pytanie, czy w przypadku takich taksonów można mówić o imprintingu genomowym. Przypuszcza się, że u rozmnażających się płciowo gatunków, jak również u pseudogamicznych apomiktów spośród genów odpowiedzialnych za rozwój endospermy, ekspresji ulegają głównie geny pochodzące od genomu ojcowskiego. Jeżeli uzna się, że te geny są wystarczające do rozwoju bielma, to w przypadku autonomicznego rozwoju endospermy, należy założyć, że ekspresji ulegają geny pochodzące od genomu matczynego, czyli nie występuje imprinting matczyny.

Być może w toku ewolucji roślin okrytonasiennych, imprinting genomowy ulegał modyfikacji bądź był „usuwany” (wymazany) kilka razy, co umożliwiło powstanie autonomicznych apomiktów w takich taksonach (GRIMANELLI i współaut. 1997).

AUTONOMICZNY ROZWÓJ BIELMA A IMPRINTING GENOMOWY

W jaki sposób może dojść do rozwoju autonomicznej endospermy *in vivo*, czyli w warunkach kiedy nie występuje zapłodnienie komórki centralnej i nie jest zachowany stosunek genomów rodzicielskich (2 matczyne : 1 ojcowski), wymagany do normalnego rozwoju bielma u rozmnażających się płciowo roślin okrytonasiennych? Przy założeniu, że u podstaw wyma-

ganego stosunku genomów leżą różnice epigenetyczne genomów rodzicielskich, co oznacza, że w każdym z genomów, określony zestaw genów jest inaktywowany w specyficzny dla danej płci sposób, można sądzić, że kiedy nastąpiłoby „usunięcie” (wymazanie) imprintingu (ang. removal of imprints) z genomu endospermy pochodzącego od matki, co doprowadziłoby do

ekspresji genów matczynych (normalnie inaktywowanych), to w efekcie mogłoby zastąpić brakujący genom ojcowski. Potwierdzeniem tej hipotezy jest uzyskany mutant *fie Arabidopsis* o

nisko zmetylowanym genomie, u którego rozwój endospermy przebiega normalnie mimo braku zapłodnienia. (VINKENOOG i współaut. 2000, VINKENOOG i SCOTT 2001).

ENDOSPERM – NUTRITIVE TISSUE FOR EMBRYO II. AUTONOMOUS DEVELOPMENT OF ENDOSPERM IN ANGIOSPERMS (ANGIOSPERMEAE)

S u m m a r y

In sexually reproducing flowering plants both embryo and endosperm development is initiated by fertilization (double fertilization) and in the vast majority of these plants a ratio of 2 maternally derived genomes to 1 paternally derived genome (2m:1p) is essential for endosperm formation and therefore for seed development. However, there is a group of taxa in which reproductive development is fertilization-independent. The occurrence of autonomous endosperm is well-known phenomenon in autonomous apomicts and a very rare one in amphimictic

taxa. The development of fertilization-independent endosperm can be induced experimentally with the use of irradiated pollen and also through *in vitro* culture of unfertilized ovules or ovaries.

In this review the problem of genomic imprinting is discussed in the light of autonomous endosperm development without paternal genome involvement. How genomic imprinting can be overcome in the case of autonomous endosperm development in flowering plants?

LITERATURA

- ADAMOWICZ E., KUTA E., PRZYWARA L., 2000. *Embryological analysis of unfertilized ovules of tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) cultured in vitro*. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 42 (Suppl.1), 34.
- BHOJWANI S. S., THOMAS T. D., 2001. *In vitro gynogenesis*. [W:] *Current Trends in the Embryology of Angiosperms*. BHOJWANI S. S., SOH W. Y., (red.). Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 489–507.
- BOHANEC B., 1994. *Induction of gynogenesis in agricultural crops: review*. Proceedings of IBPA, 5–7 December 1994, Rogla, 43–55.
- BROULAND M., 1968. *A propos de la formation de l'albumen à partir du noyau secondaire non fécondé chez l'Anemone nemorosa*. Ann. Univ. Ares 5, 165–169.
- CAMPION B., BOHANEC B., JAVORNIK B., 1995. *Gynogenic lines of onion (Allium cepa L.): evidence of their homozygosity*. Theoret. Appl. Genet. 91, 598–602.
- CASTILLO A. M., CISTUE L., 1993. *Production of gynogenic haploids of Hordeum vulgare L.* Plant Cell Rep. 12, 139–143.
- CHMIELOWIEC M., KUTA E., PRZYWARA L., 1997. *An attempt to induce gynogenesis in Brassica napus L.* Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. Zool. 38 (Suppl. 1), 49.
- CZAPIK R., 1991. *Some research problems of the endosperm in Angiospermae*. Polish Bot. Stud. 2, 109–120.
- CZAPIK R., 1997. *Theoretical aspects of apogamy in Angiosperms*. Bull. Polish Acad. Sci. Biol. Sci. 45, 2–4.
- CZAPIK R., 1999. *Enigma of apogamy*. Protoplasma 208, 206–210.
- CZAPIK R., 2000a. *Controversy around apomixis*. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 42/2, 55–59.
- CZAPIK R., 2000b. *Apomixis in Monocotyledons*. [W:] *Grasses: Systematic and Evolution*. JACOBS S. W., EVERETT J. (red.). CSIRO, Melbourne, 316–321.
- CZAPIK R., KOŚCIŃSKA-PAJAK M., 2000. *Apomictic studies and agamospermy in Polish flora*. Bot. Guidebooks 24, 129–149.
- FALQUE M., KODIA A. A., SOUNIGO, ESKES A. B., CHARRIER A., 1994. *Gamma irradiation of cacao (Theobroma cacao L.) pollen: effect on pollen grain viability, germination and mitosis and on fruit set*. Euphytica 64, 167–172.
- FARIS N. M., NIEMIROWICZ-SZCZYTT K., 1999. *Cucumber (Cucumis sativus L.) embryo development in situ after pollination with irradiated pollen*. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 41, 411–418.
- GOLDBERG R. B., FISCHER R. L., 1999. *Control of fertilization-independent endosperm by the MEDEA polycomb gene in Arabidopsis*. Plant Biol. 96, 4186–4191.
- GRIMANELLI D., HERNANDEZ M., PERROTI E., SAVIDAN Y., 1997. *Dosage effects in the endosperm of diplosporous apomictic Tripsacum (Poaceae)*. Sex. Plant Reprod. 10, 279–282.
- GRIMANELLI D., TOHME J., GONZÁLEZ-DE-LEÓN D., 2001. *Application of molecular genetics in apomixis research*. [W:] *The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering*. SAVIDAN Y., CARMAN J. G., DRESSELHAUS T. (red.). CIMMYT, IRD & EU's RTD FAIR program, 83–94.
- GROSSNIKLAUS U., 2001. *From sexuality to apomixis: molecular and genetic approaches*. [W:] *The Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering*. SAVIDAN Y., CARMAN J. G., DRESSELHAUS T. (red.). CIMMYT, IRD & EU's RTD FAIR program, 168–211.
- GROSSNIKLAUS U., VIELLE-CALZADA J. P., HOEPNER M. A., GAGLIANO W. B., 1998. *Maternal control of embryogenesis by MEDEA a polycomb group gene in Arabidopsis*. Science 280, 446–450.
- GROSSNIKLAUS U., SPILLANE C., PAGE D. R., KOHLER C., 2001. *Genomic imprinting and seed develop-*

- ment: Endosperm formation with and without sex. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 21–27.
- HUANG Q. F., YANG H. Y., ZHOU C., 1982. *Embryological observation on ovary culture of unpollinated young flowers of Hordeum vulgare L.* *Acta Bot. Sin.* 24, 295–300.
- IZMAILOV R., 1986. *Cyto-embryological studies on Alchemilla L. (series Calycinae Buser). II. Apomictic processes in ovules.* *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* 28, 39–63.
- IZMAILOV R., 1994. *Embryo and endosperm relations at early stages of their development in Alchemilla subsect. Heliodrosium (Rosaceae).* *Polish Bot. Studies* 8, 61–67.
- JAMES D. J., PASSEY A. J., MACKENZIE K. A. D., MENHINICK E. C., 1985. *The effect of pollen irradiation on the development of the postfertilization ovule of apple (Malus pumila Mill.). [W:] Experimental Manipulation of Oule Tissues.* CHAPMAN G. P. C., MANTELL S., DANIELS R. (red.). Longman, London, 210–224.
- JENSEN W. A., SCHULTZ P., ASHTON M. E., 1977. *An ultrastructural study of early endosperm development and synergid changes in unfertilized cotton ovules.* *Planta* 133, 179–189.
- KIYOSUE T., OHAD N., YADEGARI R., HANNON M., DINNEY M., WELLS D., KATZ A., MAGROSSIAN L., HARADA J. J., GOLDBERG R. B., FISCHER R. L., 1999. *Control of fertilization-independent endosperm by the MEDEA polycomb gene in Arabidopsis.* *Plant Biol.* 96, 4186–4191.
- KOLTUNOW A. M., 1993. *Apomixis: Embryo sac and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules.* *Plant Cell* 5, 1425–1437.
- KOLTUNOW A. M., BICKNELL R. A., CHAUDHRURY A. M., 1995. *Apomixis: Molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization.* *Sex. Plant Reprod.* 12, 253–266.
- KOŚCIŃSKA-PAJĄK M., 1996. *Embryological problems in the apomictic species Chondrilla juncea L. (Compositae).* *Folia Geobot. Phytotax.* 31, 397–403.
- LAIKOVA L. I., 1976. *Cytoembryological findings about autonomous formation of endosperm in maize. [W:] Apomixis and Breeding.* KHOKHLOV S. S. (red.). Amerind, New Delhi, 109–112.
- LE DEUNEF E., SAUTON A., 1994. *Effect of parthenocarpy on ovule development in cucumber (Cucumis sativus L.) after pollination with normal and irradiated pollen.* *Sex. Plant Reprod.* 7, 221–228.
- LUO M., BILODEAU P., KOLTUNOW A., DENNIS E. S., PEACOC W. J., CHAUDHURY A. M., 1999. *Genes controlling fertilization-independent seed development in Arabidopsis thaliana.* *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96, 296–300.
- LUO M., BILODEAU P., KOLTUNOW A., DENNIS E. S., PEACOC W. J., CHAUDHURY A. M., 2000. *Expression and parent-of-origin effects for FIS2, MEA, and FIE in the endosperm and embryo of developing Arabidopsis seeds.* *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97, 10637–10642.
- MAŁECKA J., 1967. *Cytoembryological studies in Taraxacum scanicum.* *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* 10, 195–207.
- MAŁECKA J., 1973. *Problems of the mode of reproduction in microspecies of Taraxacum section Palustris Dahlstedt.* *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* 16, 127–135.
- MAŁECKA J., 1982. *Further embryological studies in the genus Taraxacum L.* *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* 24, 143–157.
- MIREK Z., PIĘKOŚ-MIREK H., ZAJĄC A., ZAJĄC M., 1995. *Vascular plants of Poland.* *Polish Bot. Studies, Guidebook Series* 15, 1–303.
- MÓL R., 1992. *In vitro gynogenesis in Melandrium album: from partenogenetic embryos to mixoploid plants.* *Plant Sci.* 81, 261–296.
- MÓL R., 1999. *Embryological aspects of in vitro gynogenesis in plant organ cultures.* *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* 41, 67–74.
- MÓL R., BETKA A., WOJCIECHOWICZ M., 1995. *Induction of autonomous endosperm in Lupinus luteus, Hel-leborus niger and Melandrium album by in vitro culture of unpollinated ovaries.* *Sex. Plant Reprod.* 8, 273–277.
- MUKHAMBETZHANOV S. K., 1997. *Culture of nonfertilized female gametophytes in vitro.* *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 48, 111–119.
- MUSIAŁ K., PRZYWARA L., 1998. *Influence of irradiated pollen on embryo and endosperm development in kiwifruit.* *Ann. Bot.* 82, 747–756.
- MUSIAŁ K., PRZYWARA L., 1999a. *Pollination with heavily irradiated pollen in Nicotiana: induced parthenogenesis and embryological study.* *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* 4, 127–137.
- MUSIAŁ K., PRZYWARA L., 1999b. *Endosperm response to pollen irradiation in kiwifruit.* *Sex. Plant Reprod.* 12, 110–117.
- MUSIAŁ K., PRZYWARA L., 2001. *Gynogeneza u roślin.* Kosmos, 1–2, 39–48.
- MUSIAŁ K., BOHANEK B., PRZYWARA L., 2001. *Embryological study on gynogenesis in onion (Allium cepa L.).* *Sex. Plant Reprod.* 13, 335–341.
- NICOLL M. F., CHAPMAN G. P., JAMES D. J., 1987. *Endosperm responses to irradiated pollen in apples.* *Theoret. Appl. Genet.* 74, 508–515.
- NOGLER G. A., 1984. *Gametophytic apomixis. [W:] Embryology of Angiosperms.* JOHRI B. (red.). Springer, Berlin, 475–518.
- OHAD N., MAGROSSIAN L., HSU Y. C., WILLIAMS C., REPPETI P., FISCHER R. L., 1996. *A mutation that allow endosperm development without fertilization.* *Plant Biol.* 93, 5319–5324.
- OHAD N., YADEGARI R., MAGROSSIAN L., HANNON M., HARADA J. J., GOLDBERG R. B., FISCHER R. L., 1999. *Mutation in FIE polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization.* *Plant Cell* 11, 407–416.
- OLSZEWSKA M., 1999. *Podstawy Cytogenetyki Roślin.* PWN, Warszawa.
- OPOKA J., 2001. *Badania embriologiczne i kultury in vitro niezapylnionych zalążni Viola x wittrockiana i V. cornuta.* Praca magisterska, Uniwersytet Jagielloński, Kraków.
- PEIXE A., CAMPOS M. D., CAVALLEIRO C., BARROSO J., PAIS M. S., 2000. *Gamma-irradiated pollen induces the formation of 2n endosperm and abnormal embryo development in European plum (Prunus do-*

- mestica* L., cv. 'Rainha Cludia Verde'). Sc. Hort. 86, 267–278.
- POGAN E., WCISŁO H., 1995. *Embryological analysis of Hieracium pilosella* L. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 37, 53–61.
- ROJEK J., 2000. *Indukcja autonomicznej endospermy w kulturze niezapylonych zalążni Brassica napus cv. Topas*. Praca magisterska. Uniwersytet Jagielloński, Kraków.
- ROJEK J., KUTA E., PRZYWARA L., 2000. *Indukcja autonomicznej endospermy w kulturze niezapylonych zalążni (Brassica napus L. cv. Topas)*. V Ogólnopolska Konferencja, Zastosowanie Kultur *in vitro* w Fizjologii Roślin. Kraków 14–15.XII. 2000, 52.
- SAVIDAN Y., 2001. *Gametophytic apomixis*. [W:] *Current Trends in the Embryology of Angiosperms*. BHOJWANI S. S., SOH W. Y. (red.). Cluwer Academic Publishers, Netherlands, 419–433.
- SKALIŃSKA M., 1973. *Further studies in facultative apomixis of Hieracium aurantiacum* L. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 16, 121–133.
- SKALIŃSKA M., KUBIEŃ E., 1972. *Cytological and embryological studies in Hieracium pratense* Tausch. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 15, 39–50.
- SKAWIŃSKA R., 1962. *Apomixis in Hieracium alpinum* L. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 5, 89–96.
- STĘPIEŃ-WIJOWSKA M., 2002. *Kultury niezapylonych zalążni i zalążników przedstawicieli rodzaju Viola L.* Praca doktorska, Uniwersytet Jagielloński, Kraków.
- TADEO F. R., TALON M., GERMAIN E., DOSBA F., 1994. *Embryo sac development and endogenous giberellins in pollinated and unpollinated ovaries of walnut (Juglans regia)*. Physiol. Plant. 91, 37–44.
- TRELA Z., 1963a. *Embryological studies in Anemone nemorosa* L. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 6, 1–14.
- TRELA Z., 1963b. *Cytological studies in the differentiation of the endosperm in Anemone nemorosa* L. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 6, 177–183.
- TRELA-SAWICKA Z., 1974. *Embryological studies in Anemone ranunculoides* L. from Poland. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 17, 1–11.
- VINKENOOG R., SCOTT R. J., 2001. *Autonomous endosperm development in flowering plants: how to overcome the imprinting problem?* Sex. Plant Reprod. 14, 189–194.
- VINKENOOG R., SPIELMAN M., ADAMS S., FISCHER R.L., DICKINSON H. G., SCOTT R. J., 2000. *Hypomethylation promotes autonomous endosperm development and rescues postfertilization lethality in fie mutants*. Plant Cell 12, 2271–2282.
- WIJOWSKA M., KUTA E., 2000. *Embryological analysis of unpollinated ovaries of Viola L. cultured in vitro*. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 42 (Suppl. 1), 31.
- WIJOWSKA M., KUTA E., PRZYWARA L., 1999a. *In vitro culture of unpollinated ovules of Viola odorata* L. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 41, 95–101.
- WIJOWSKA M., KUTA E., PRZYWARA L., 1999b. *Autonomous endosperm induction by in vitro culture of unfertilized ovules of Viola odorata* L. Sex. Plant Reprod. 12, 164–170.
- YANG H.Y., ZHOU C., 1982. *In vitro induction of haploid plants from unpollinated ovaries and ovules*. Theoret. Appl. Genet. 63, 97–104.
- YANG H.Y., ZHOU C., CEI D., YAN H., CHEN X., 1986. *In vitro culture of unfertilized ovules in Helianthus annuus* L. [W:] *Haploids of Higher Plants in vitro*. HU H., YANG H. (red.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 182–191.
- ZHANG Y. X., LESPINASSE Y., 1991. *Pollination with gamma-irradiated pollen and development of fruits, seeds and parthenogenetic plants in apple*. Euphytica 54, 101–109.
- ZHOU C., YANG H., 1981. *Induction of haploid rice plantlets by ovary culture*. Plant Sci. Lett. 20, 231–237.