

JOANNA LEŚNIEWSKA
*Zakład Botaniki
Instytut Biologii
Uniwersytet w Białymstoku
ul. Świerkowa 20B, 15-950 Białystok
e-mail: joanles@uwb.edu.pl*

TAPETUM PYLNIKOWE W ASPEKCIE PROGRAMOWANEJ ŚMIERCI KOMÓRKI

WPROWADZENIE

Programowana śmierć komórkowa (ang. programmed cell death, PCD) tapetum pylnikowego jest spektakularnym przykładem naturalnej eliminacji tkanki roślinnej w normalnym rozwoju organu związanego z reprodukcją. Zamiernie tapetum w dojrzewającym pylniku roślin wyższych było znane botanikom od dawna i w piśmiennictwie embriologicznym określano jako degeneracja. Nieuchronność i powszechność tego procesu, zachodzącego w bezpośrednim sąsiedztwie prawidłowo rozwijającego się pyłku, wskazywały na genetycznie zakodowany mechanizm sterujący śmiercią tapetum. Odkrycie apoptozy – morfologicznego scenariusza PCD w komórkach zwierzęcych (KERR i współaut. 1972), które początkowo nie wzbudziło wielkiego zainteresowania środowiska naukowego, zapoczątkowało nowy kierunek w badaniach biologicznych nad śmiercią komórek. Prawdziwa eksplozja badań nad przebiegiem PCD nastąpiła w minionej dekadzie, głównie dzięki rozwojowi nowoczesnych technik molekularnych. Eksperymenty prowadzone nad apoptozą komórek zwierzęcych i ludzkich (znacznie bardziej zaawansowane ze względu na znaczenie tych badań dla medycyny) i równoczesne poszukiwania odpowiednika tego zjawiska w świecie roślin, potwierdziły uniwersalny charakter PCD jako ewolucyjnie utrwalonego procesu autodestrukcji komórek we wszystkich organizmach eukariotycznych, ale wskazywały też na różnice w jego mechani-

zmie i regulacji u zwierząt i roślin (GREENBERG 1996; HAVEL i DURZAN 1996, 1999; JACKOWSKI 1997; DANON i współaut. 2000; HOEBERICHTS i WOLTERING 2002). Komórki roślinne cechuje pewna odmienność i znacznie większa różnorodność morfotypów śmierci w porównaniu z modelem apoptozy, co wynika ze specyfiki ich budowy i ostatecznego przeznaczenia (BEERS 1997).

Degenerację tapetum pylnikowego uznano niejako *a priori* za przejaw śmierci programowanej jeszcze przed wykazaniem w tej tkance molekularnych znaczników PCD (BEDINGER 1992, GOLDBERG i współaut. 1993, LEŚNIEWSKA 1996, CHARZYŃSKA 1997). O precyzyjnie realizowanym autonomicznym programie śmierci komórek tapetum świadczyły wcześniejsze badania ultrastrukturalne. Także pierwsze wyniki uzyskane na roślinach transgenicznym wskazywały jednoznacznie, że zarówno opóźnienie, jak i przyspieszenie śmierci tapetum w stosunku do normy rozwojowej danego gatunku powoduje męską sterylność. Badania dojrzewających pylników wskazują na działanie wielorakiego systemu proteolitycznego, zaangażowanego w naturalną degradację tkanek (BEERS 1997, WANG i współaut. 2001) oraz typowego dla innych form programowanej śmierci internukleosomalnego cięcia DNA (WANG i współaut. 1999). Mechanizmy inicjujące programowaną śmierć tapetum oraz warunkujące jej realizację pozostają dotychczas nieznane.

Prace nad strukturalnymi i molekularnymi przejawami programowanej śmierci tapetum na poziomie komórkowym podjęto przed kilku laty w zespole prof. Marii Charzyńskiej w Zakładzie Anatomii i Cytologii Roślin UW. U kilku gatunków roślin wykazano postępującą w czasie internukleosomalną degradację jądrowego DNA, uznawaną za uniwersalny wyznacznik PCD (LEŚNIEWSKA i współaut. 1997, 2000; SIKORA 1998; LEŚNIEWSKA 1999), skorelowaną

ze zmianami strukturalnymi jąder i pozajądrowych organelli/przedziałów komórkowych, które ostatecznie prowadzą do wytworzenia okrywy pyłkowej. Ostatnio wykazano także (LEŚNIEWSKA i współaut. 2003), że w czasie programowanej śmierci tapetum pylnikowego dochodzi do spadku potencjału transbłonowego mitochondriów.

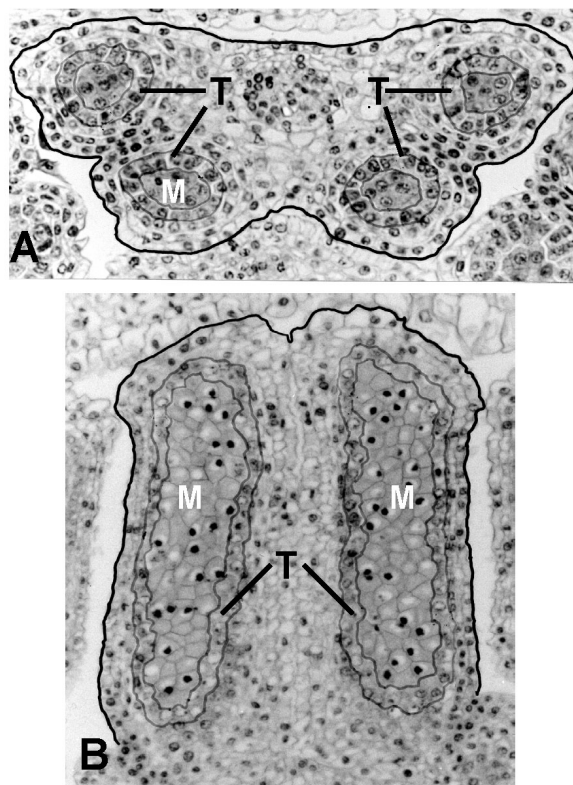
CZYM JEST TAPETUM PYLNIKOWE

Tapetum (gr. tapes = dywan, warstwa wyściełająca) jest najbardziej wewnętrzną, somatyczną tkanką każdego woreczka pyłkowego (mikrosporangium) w pylniku roślin nasennych, która otacza w formie kapsuły męskie mejocyty (Ryc. 1) i powstające z nich mikrospory rozwijające się w ziarna pyłku. Komórki tapetum wykazują szczególne cechy cytologiczne: (a) wcześniej stają się poliploidalne (i zwykle dwujądrowe); (b) tracą plazmodesmy z przyległymi tkankami (mejocytami i warstwą pośrednią); (c) rozpuszczają własną ścianę komórkową, (d) przez resztę życia pozostają w formie spolaryzowanych, sekrecyjnie aktywnych protoplastów, które zamierają przed otwarciem się kwiatu. W zależności od typu tapetum jego protoplasty zachowują do czasu rozpadu swoją indywidualność i pierwotne położenie na obrzeżach komory pylnika (tapetum sekrecyjne, parietalne) (patrz Ryc. 4 A, B, C) albo przyjmują postać amebowatą, wnikając do wnętrza pylnika, zlewając w formę komórczaka (Ryc. 2) i w takiej postaci degenerują po okresie aktywności (tapetum ameboidalne, plazmodium).

Relacje między tapetum pełniącym wyspecjalizowane funkcje wydzielnicze a komórkami męskiej linii płciowej przejawiają się ich ścisłą synchronizacją rozwojową, potwierdzoną także w doświadczeniach z roślinami transgenicznymi (WORRALL i współaut. 1992). Tapetum zapewnia pyłkowi ochronę i dostarcza niezbędnych substancji odżywczych, wydzielając enzymy degradujące ścianę tetrad, uczestniczy w budowie egzyny i innych specyficznych struktur w pylniku. Produkty rozpadu tapetum przeniesione na powierzchnię sporodermi (ściana pyłku złożona z egzyny i intyny) tworzą specyficzną okrywę pyłkową (ang. pollen coat), ułatwiającą zapylenie i rozpoznanie zgodnego pyłku na znamieniu słupka

(BHANDARI 1984, PACINI i współaut. 1985, PACINI 1990).

Zidentyfikowano liczne geny jądrowe przejawiające specyficzną ekspresję w tapetum, zależnie od jego stadium rozwojowego (KOLTUNOW i współaut. 1990, SCHRAUWEN i współaut. 1996, FERREIRA i współaut. 1997). Są wśród nich geny kodujące oleozyny, kalazę, enzymy włączone w biosyntezę lipidów czy flawonoidów, jednak rola wielu produktów tapetalnych genów pozostaje niejasna. Wiadomo, że zakłócenia

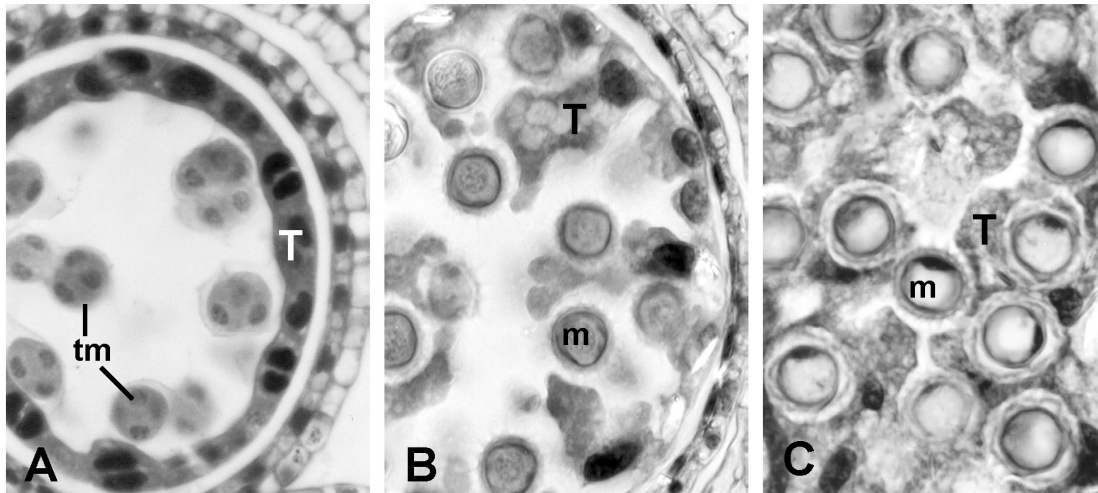


Ryc. 1. Młody pylnik *Ornithogalum virens* na przekroju poprzecznym (A) i podłużnym (B).

T – tapetum sekrecyjne, M – męskie mejocyty. Pow. 200x

funkcji genów tej tkanki, powstałe w warunkach naturalnych lub spowodowane technikami inżynierii genetycznej (MARIANI i współaut. 1990, KAPOOR i współaut. 2002), prowadzą do przedwczesnej lub opóźnionej śmierci tapetum, co w konsekwencji wywołuje męską steryl-

Śmierć tapetum ma jeszcze jeden aspekt. Dokonując się w fazie dojrzewania pylnika, w koordynacji z zamieraniem komórek warstwy pośredniej, tkanek tworzących przegrody (septa) oddzielające sąsiadujące woreczki pyłkowe oraz komórek wokół stomium (predystynowa-



Ryc. 2. Rozwój tapetum typu plazmidium w pylniku słonecznika, *Helianthus annuus*.

A. Komórki tapetum (T) na peryferiach komory pylnika – stadium tworzenia tetrad (tm). B. Inwazja protoplastów tapetum (T) do komory pylnika – stadium młodej mikrospory (m). C. Fuzja protoplastów tapetum (T) i tworzenie plazmidium – stadium późnej mikrospory (m). Pow. 420x

ność. Żywy pyłek, zdolny do wytworzenia łagiewki pyłkowej może powstać tylko w wyniku niezakłóconej ekspresji zarówno własnego genomu haploidalnego, jak i genomu sporofitu macierzystego.

Przytoczone wyżej fakty świadczą o tym, że nie tylko właściwe różnicowanie, ale także nieprzypadkowa, zachodząca w odpowiednim czasie śmierć tapetum pylnikowego zapewnia wytworzenie prawidłowych ziaren pyłku przenoszących męskie gamety lub ich komórkę macierzystą, a więc warunkuje męską płodność roślin.

nego miejsca do tworzenia szczeliny przez którą wydostanie się pyłek), realizuje genetyczny program pęknięcia pylnika i rozpraszania dojrzałego pyłku (GOLDBERG i współaut. 1993), (Ryc. 3).

Pylnik roślin nasiennych jest organem, w którym kilka tkanek podlega programowanej śmierci według indywidualnego scenariusza. Najwcześniej, jeszcze na etapie zawiązka pylnika, proces PCD obejmuje różnicujące się elementy przewodzące ksylemu w wiązce waskularnej.

JAK DŁUGO ŻYJE TAPETUM I KIEDY ZAMIERA

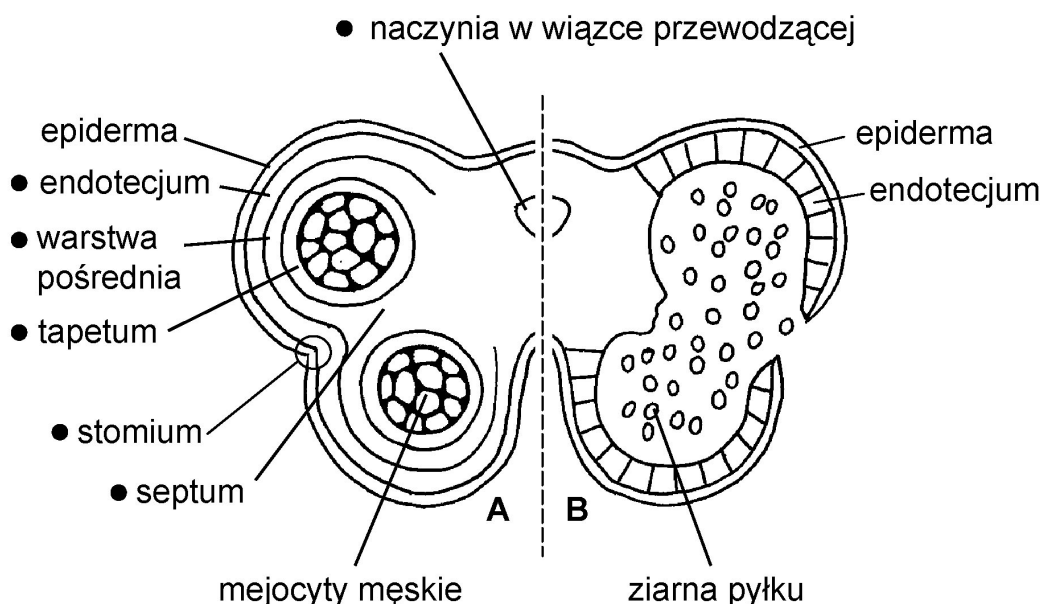
Czas istnienia tapetum w pylniku jest ściśle skorelowany z długością rozwoju męskiego gametofitu u danego gatunku. U okrytonasiennych trwa od kilku dni do kilku tygodni, a u nagonasiennych z zimującymi mikrosporangiami nawet powyżej 6 miesięcy (PACINI 1990). Tapetum zamiera stopniowo, ale stosunkowo szybko, jeszcze w zamkniętym pąku kwiatowym. W tygodniowym przedziale życia tej tkanki u śniedka *Ornithogalum virens* (badania własne i współpracowników) zmiany stuk-

turalne trwają 1–2 dni, a rozpad komórek następuje na kilka dni przed antezą (otwarcie kwiatu). Są gatunki, gdzie tapetum może utrzymywać się jeszcze na dzień przed otwarciem pylników, jednak w momencie wypylania pyłku tapetum jako tkanka już nie istnieje. Zachowane są tylko jej pozostałości na powierzchni pyłku oraz pewne struktury wytworzone wcześniej przez żywą tkankę.

Długość trwania i przebieg naturalnej degradacji tapetum są cechami gatunkowymi

(PARKINSON i PACINI 1995). Pomimo indywidualnych różnic w zakresie tempa przemian i cytomorfologii komórek, zmiany strukturalne towarzyszące degeneracji protoplastów tapetum sekrecyjnego w ogólnym zarysie obejmują: obkurczanie się komórek i jąder komórkowych, kondensację chromatyny, degradację plasty-

oznaki nie są jednoznacznie interpretowane. Zwraca się uwagę na skurcz komórek (PACINI i współaut. 1999, LEŚNIEWSKA 1999, SUZUKI i współaut. 2001) lub na zmiany w strukturach cytoplazmatycznych (MURGIA i współaut. 1991). Pierwsze zmiany strukturalne w protoplastach tapetum zaczynają się najczęściej w fa-



Ryc. 3. Zmiany w budowie pylnika wywołane procesem PCD (schemat).

Przekrój poprzeczny przez: A – młody pylnik, B – dojrzały, pęknięty pylnik. Tkanki zdeterminowane do PCD zostały oznaczone.

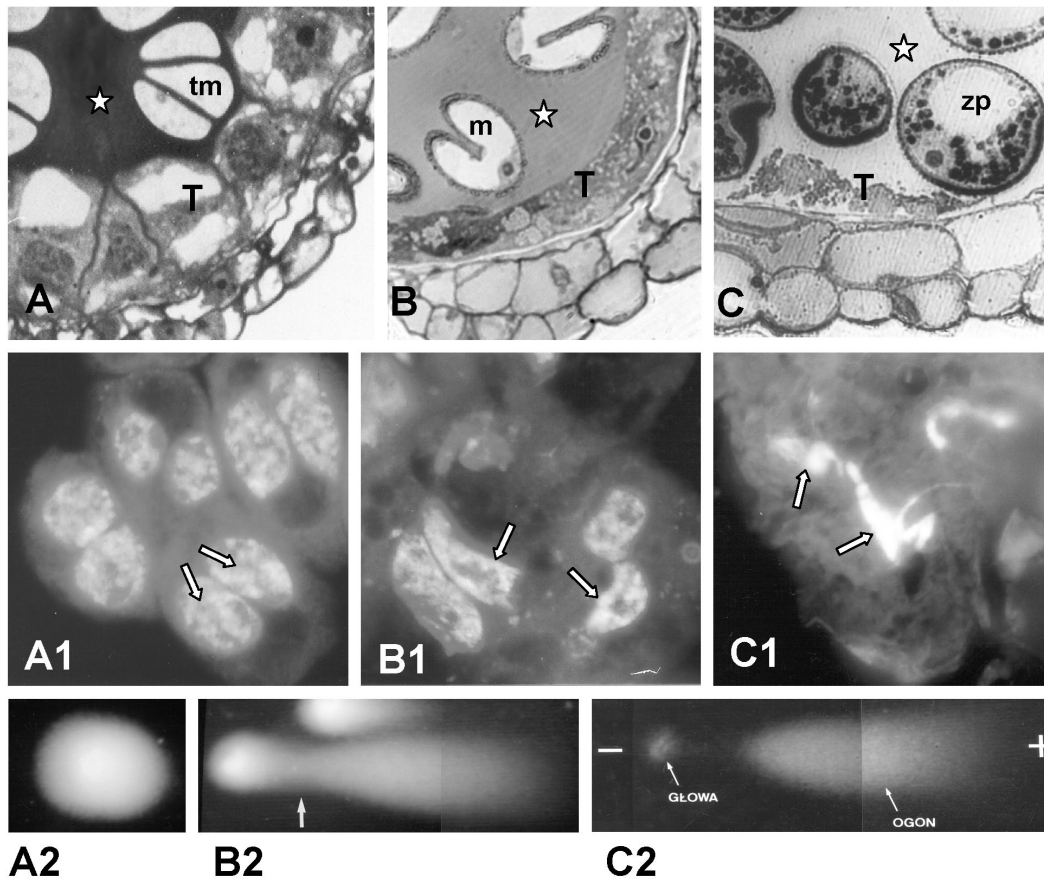
dów i gromadzenie w nich lipidowych plastoglobul, odkładanie lipidów w cytoplazmie, rozpad cystern ER i pozostałych organelli i ostatecznie zanik ciągłości błony plazmatycznej, powodujący uwolnienie produktów degradacji protoplastu do komory pylnika. Zamieranie tapetum ameboidalnego, w przeciwieństwie do sekrecyjnego, jest poprzedzone wzrostem wakuolizacji protoplastu, ale destrukcja organelli przebiega podobnie i prowadzi do wytworzenia składników okrywy pyłkowej.

Stan zachowania struktur komórkowych w momencie dezintegracji plazmalemy tapetum rzadko pozwala na ich identyfikację. Zwykle cała zawartość komórek jest zmodyfikowana i przekształcona w bezstrukturalną masę z dużą zawartością lipidów, obfitych zwłaszcza u roślin owadopylnych; u wiatropylnych tkanka tapetalna zanika prawie bez śladu (PACINI 1990).

Degeneracja tapetum, utożsamiana z dojrzewaniem lub starzeniem tkanki, jest procesem metabolicznym, którego początkowe

zmiany u młodych, wakuolizujących się mikrospor, a rozpad komórek, zależnie od gatunku, może nastąpić jeszcze przed podziałem różnicującym mikrospor albo w różnych fazach dojrzewania pyłku.

Sugeruje się, że rodzaj techniki utrwalania materiału wpływa znacząco na stan zachowania tkanek, a stosowane najczęściej utrwalacze chemiczne (aldehid glutarowy i czterotlenek osmu) mogą dawać błędną ocenę dezorganizacji komórek w okresie wcześniejszym niż faktyczny. Po użyciu takich technik jak utrwalanie po zamrożeniu (ang. freeze-fixation and substitution) (HESSE i HESSE 1993, HESS i HESSE 1994) czy modyfikacji chemicznego utrwalania przez dodanie cyjanku żelazowo-potasowego (WEBER 1992, SANTOS i współaut. 2003) tapetum wykazuje niezmienną morfologię przez znacznie dłuższy czas. Jednak każdy ze sposobów utrwalania daje nieco inny obraz, zachowując pewne struktury lepiej inne gorzej. Metoda freeze-fixation nie powoduje przemieszczeń lipidów i utrzymuje specy-



Ryc. 4. A, B, C. Tapetum sekrecyjne w trzech wybranych stadiach rozwoju na przekroju poprzecznym pylnika *Ornithogalum virens*; *komora pylnika.

A. Komórki tapetum (T) w czasie hydrolizy ściany, przed degradacją protoplastu – stadium tetrad (tm). B. Protoplasty tapetum (T) w czasie degradacji – stadium późnej mikrospory (m). C. Rozpad protoplastów tapetum (T) – wczesne stadium 2-komórkowego pyłku (zp). Pow. 370x. A1, B1, C1. Wyizolowane z pylnika 2-jądrowe protoplasty tapetum ze stadiów A, B, C; DNA po reakcji z DAPI (mikroskop fluorescencyjny). A1. Jądra tapetum kuliste lub owalne, bez kondensacji chromatyny (strzałki); B1. Jądra tapetum płatkowate i obkurczone, widoczna kondensacja chromatyny w peryferycznej części jąder (strzałki); C1. Nieregularne jądra tapetum z silnie skondensowaną chromatyną (strzałki). Pow. 600x. A2, B2, C2. Wynik testu kometkowego dla DNA tapetum ze stadiów A, B, C. DNA po reakcji z DAPI (mikroskop fluorescencyjny). Położenie elektrod (- katoda, + anoda) na Ryc. A2 i B2 jak na Ryc. C2; A2. Brak kometki, nie pocięte DNA wypełnia jądro tapetum; B2. Kometka z DNA pociętego podczas PCD, widoczne przewężenie (strzałka) między głową i ogonem, powyżej fragment jądra innej komórki pylnika; C2. Zaawansowana fragmentacja DNA w jądrze tapetum, migracja większości pociętego DNA do anody (+).

ficzną strukturę białek (niszczoną utrwalczaczami chemicznymi), umożliwiając ich immunodetekcję (ROSS i współaut. 2000), ale matriks organelli komórkowych i sok pylnikowy są widoczne jako obszary silnie osmofilne, w przeciwieństwie do cytoplazmy. Bez względu na stosowaną technikę utrwalania pewne

zmiany w tapetum mają charakter nieodwracalny (skurcz komórek, kondensacja chromatyny, odkładanie lipidów) i świadczą o postępującej degradacji tkanki.

TAPETUM JAKO TKANKA MODELOWA DO BADANIA PCD U ROŚLIN

Tapetum pylnikowe z wielu względów jest dobrą tkanką modelową do badania naturalnego procesu programowanej śmierci w organie roślinnym. Możliwa jest analiza ciągłości

jej rozwoju od momentu uformowania w pylniku do zupełnego zniszczenia i przekształcenia w okrywę pyłkową. Wszystkie komórki tapetum w pojedynczym mikrosporangium, w

całym pylniku i w danym okółku pylników w kwiecie cyklicznym cechuje wysoka synchronizacja rozwojowa, co ułatwia pobieranie odpowiednich próbek materiału. Wysoka korelacja rozwoju tapetum i komórek męskiej linii płciowej pozwala identyfikować każdy etap rozwoju tapetum na podstawie fazy różnicowania pyłku, także na poziomie ultrastrukturalnym.

Istotnym problemem w badaniach tapetum pozostaje znalezienie skutecznej metody szybkiego wyodrębnienia z pylnika czystej frakcji jego nieuszkodzonych, żywych protoplastów. Nie ma też dotąd możliwości badania rozwoju

tej żywej tkanki poza organem ani bezpośrednio w pylniku.

Prace modelowe nad PCD u roślin prowadzi się często w warunkach sztucznych, np. w hodowlach komórkowych, jak w przypadku ksylogenezy u cynii (*Zinnia elegans*), jednakże znaczenie uzyskiwanych tą drogą wyników dla procesów zachodzących w ontogenezie rośliny nie jest do końca jasne. Badanie naturalnej śmierci tkanki położonej wewnątrz organu i pozostającej pod wpływem kompleksu nie zawsze możliwych do zdefiniowania bodźców jest o wiele trudniejsze, niż posługiwanie się układem eksperymentalnym.

JAK PRZEBIEGA PCD W TAPETUM

Z definicji PCD wynika, że programowana śmierć komórkowa jest genetycznie kontrolowanym procesem autodestrukcji komórek, indukowanym bodźcami endo- bądź egzogennymi, obejmującym charakterystyczne zmiany morfologiczne i biochemiczne, wymagającym zaangażowania przez komórkę jej własnego aparatu molekularnego. W apoptozie komórek zwierzęcych wyodrębniono umownie trzy etapy: (1) fazę indukcji – kumulowania bodźców skłaniających komórkę do samounicestwienia, (2) fazę wykonawczą – włączenia molekularnych narzędzi programu śmierci,

oraz (3) fazę degradacji, czyli zniszczenia komórki.

Można przypuszczać, że podobne etapy występują także w procesie PCD u roślin, pomimo że realizowane są w inny sposób. W tapetum pylnikowym stosunkowo najlepiej poznana jest faza strukturalnego zniszczenia i dlatego będzie omówiona szerzej. Badania molekularnego podłoża zmian w tej tkance są mało zaawansowane, ale najmniej wiadomo o sygnałach stymulujących wybiórczo tapetum i inne tkanki młodego pylnika do wejścia na drogę wcześniejszej śmierci.

DEGRADACJA STRUKTURALNA TAPETUM

Degradacja struktur komórkowych jest uważana za wizualny, końcowy etap PCD, ale w przypadku tapetum pewne elementy morfologiczne jego komórek są redukowane stopniowo w ciągu życia tkanki. Utrata części plazmodesm i rozpuszczenie własnych ścian zachodzi z dużym wyprzedzeniem w stosunku do zmian w protoplaście i trudno rozstrzygnąć, czy są to przejawy różnicowania czy oznaki programowanej śmierci. Młode komórki tapetum tracą plazmodesmy z tkankami sąsiednimi z początkiem mejozy, ale zachowują je w obrębie własnej tkanki, co sprzyja synchronizacji jej rozwoju. Nie wiadomo jakie znaczenie dla losów tapetum ma wczesna izolacja jego symplastu (protoplastów połączonych plazmodesmami) od pozostałych tkanek pylnika, ale w przypadku apoptozy u zwierząt zanik połączeń (innego typu niż plazmodesmy) z komórkami

przyległymi jest wystarczającym sygnałem do samounicestwienia komórek.

Z kolei hydroliza ścian komórek tapetum, która zależnie od gatunku następuje w trakcie mikrosporogenezy, bądź po jej zakończeniu, i poprzedza najbardziej aktywny okres metaboliczny tapetum, nie wydaje się być etapem stopniowego niszczenia komórek, ale istotnym przejawem ich różnicowania. Brak ściany pozwala na szybsze przenikanie wydzielin z tapetum do komory pylnika, a sposób kontaktowania się komórek zmienia się zasadniczo po rozpadzie tetrad i zaniku kalozy izolującej mikrospory. Wymiana substancji między tapetum a komórkami linii postmeiotycznej dokonuje się za pośrednictwem soku pylnikowego lub bezpośrednio poprzez tapetalną plazmalemę, stykającą się ze sporoderłą mikrospor/ziaren pyłku.

Degradacja protoplastu tapetum następuje po okresie największej jego aktywności wydzielniczej i ma na celu przekształcenie struktur komórkowych w materiały użyteczne dla pyłku. W licznych opisach rozwoju tapetum często brakuje szczegółowych informacji o przebiegu destrukcji organelli, poprzedzającej rozpad tkanki. Może to wynikać z szybkości przemian i trudności dobrego utrwalenia degenerujących protoplastów.

Demontaż komórek tapetum przebiega w sposób uporządkowany i wykazujący następ-

stwo zmian, bez powrotu do stadiów wcześniejszych. Hipoteza o występowaniu w tapetum cykli aktywności sekrecyjnej, którym mogą towarzyszyć oznaki starzenia (poszerzone ER, liczne pęcherzyki, krople lipidów w cytoplazmie), na przemian z fazami odróżnicowania komórek (ROWLEY 1993), nie znajduje szerszego potwierdzenia poza nielicznymi przypadkami analizowanymi przez jej autora.

JAKĄ ROLĘ ODGRYWAJĄ WAKUOLE PODCZAS PCD TAPETUM ?

Przypuszcza się, że zanik integralności tonoplastu, poprzedzony wzrostem poziomu jonów wapnia w komórce może być powszechnym zdarzeniem zapoczątkowującym fazę degradacji w większości przypadków PCD u roślin (JONES 2001). Rozpad tonoplastu prowadzi w takiej sytuacji do autolizy składników komórki pod działaniem enzymów hydrolitycznych uwolnionych z wakuoli. Innym, wykorzystywanym przez rośliny sposobem eliminacji struktur cytoplazmatycznych, jest ich odseparowanie i trawienie wewnątrz wakuol autofagowych rozmaitego pochodzenia (JONES 2000).

Rola systemu wakuolarnego w degradowanym tapetum jest niejasna. Nieznany jest też mechanizm jego zanikania. Nie odnotowano w tej tkance, u żadnego z badanych do tej pory gatunków, procesu podobnego do autolizy opisanej w różnicujących się naczyniach ksylemu (FUKUDA 1996, FUKUDA i współaut. 1998). Momentem krytycznym w procesie ksylogenezy jest rozpad wakuoli i pojawiające się w następstwie uwolnienia enzymów zmiany morfologiczne: pęcznienie i szybka degradacja organelli, najpierw systemu endomembran (ER i aparatu Golgiego), następnie otoczonych podwójną błoną mitochondriów, chloroplastów i jądra. Pierwszym symptomem degradacji jądra jest tu

pęcznienie otoczki jądrowej, a nie kondensacja chromatyny.

Nie wiadomo, czy i w jakim stopniu w procesach litycznych protoplastu tapetum uczestniczą enzymy wakuolarne. Istnieją doniesienia o wakuolach autofagowych w starzejącej się tkance tapetalnej u wielu gatunków, np. oliwki, *Olea europaea* (PACINI i CASADORO 1981), cykorii, *Cichorium intybus* (PACINI i KEIJZER 1989), oplątwy, *Tillandsia albida* (PACINI i współaut. 1999), sosny, *Pinus sylvestris* (ROWLEY i współaut. 2000), ale nie ma pewności, czy występują powszechnie. Nie stwierdzono ich podczas degradacji tapetum sekrecyjnego *Ornithogalum virens* (LEŚNIEWSKA 1999). U tej rośliny zmiany wakuolarne pojawiają się równocześnie ze skurczem komórek i początkiem kondensacji chromatyny, ale niesynchronicznie w całej tkance i obejmują kolejno: zagęszczenie soku komórkowego, zanikanie wyrazistości tonoplastu, zmianę kształtu wakuol na nieregularny oraz ich bliski kontakt z systemem cystern ER przed ostatecznym zanikiem. Nie wiadomo, jakie procesy (autolizy czy nekrozy) zachodzą po rozpadzie komórek tapetum w szczątkach jego cytoplazmy, gdyż nie badano do tej pory tego zagadnienia.

ZMIANY JĄDROWE W TAPETUM

Kondensacja chromatyny i internukleosomalna fragmentacja jądrowego DNA (nDNA) są powszechnie akceptowane jako uniwersalne znaczniki PCD. Obie cechy zostały wykazane podczas degradacji tapetum pylnikowego.

KONDENSACJA CHROMATYNY

Kondensacja chromatyny w apoptozie, inaczej niż podczas podziału komórki, wiąże się z fragmentacją jądrowego DNA (WIDŁAK 2002). W apoptotycznych jądrach komórek zwierzęcych skondensowana chromatyna, początko-

wo położona marginalnie, z czasem wypełnia całe jądro, które kurczy się i ulega fragmentacji.

W tapetum pylnikowym kondensację chromatyny poprzedza zmiana kształtu jądra na płatowaty i nieregularny, a jej rozmieszczenie nie zawsze przypomina wzór typowy dla apoptozy. Obserwowano skondensowaną chromatynę na obwodzie jądra (PAPINI i współaut. 1999), albo w postaci kulistych agregatów rozproszonych w całym jego obszarze (STEER 1977) lub leżących bliżej otoczki, ale z dala od dużego jąderka, jak u *Ornithogalum virens* (LEŚNIEWSKA 1999). U tej rośliny stwierdzono postępującą kondensację chromatyny wraz z deformacją jąder i całego protoplastu (Ryc. 4 A1, B1, C1). U żadnego z badanych do tej pory gatunków nie obserwowano fragmentacji jąder tapetum przed rozpadem protoplastów.

FRAGMENTACJA JĄDROWEGO DNA

Internukleosomalna fragmentacja jądrowego DNA (nDNA) zachodzi pod działaniem specyficznych endonukleaz tnących DNA w regionach łączników na odcinki będące wielokrotnością nukleosomów ($n \times \text{ok. } 200 \text{ par zasad, bp}$). Wstępnie materiał genetyczny może być cięty na większe fragmenty o długości 50–300 tys. bp. Specyficznie pocięte DNA można wykryć różnymi metodami.

„Drabinkę” DNA uzyskuje się na żelu agarozowym z DNA wyizolowanego z dużej liczby komórek (co najmniej 10^6) i rozdzielonego drogą elektroforezy na oligonukleosomalne fragmenty różniące się masą cząsteczkową. Nie uzyskano do tej pory drabinki z nDNA tapetum, tylko z całkowitego DNA pylnika jęczmienia, *Hordeum vulgare* (WANG i współaut. 1999). Wynik ten dał ogólną informację o toczącym się procesie PCD w dojrzewającym pylniku, a równocześnie brak drabinki w pylniku już dojrzałym był oznaką zaniku degradowanych wcześniej tkanek.

Test kometkowy (ang. comet assay) służy jako szybka i czuła metoda wykrywania pęknięć pojedynczej i podwójnej nici DNA (zależnie od procedury) w jądrach komórek zatopionych w agarozie (JAŁOSZYŃSKI i współaut. 1996). Pocięte, ujemnie naładowane fragmenty cząsteczki nDNA migrują w polu elektrycznym w kierunku anody (+), dając obraz przypominający kometę, której kształt zależy od ilości i jakości uszkodzeń DNA. Dla procesu PCD charakterystyczne są kometki z głową i ogonem. Głowy ko-

met znajdują się w miejscu pierwotnego położenia jąder na żelu, a ogony stanowią migrujące polianiony DNA uwolnione z głowy, tym większe im bardziej zaawansowana jest fragmentacja. DNA komórek nekrotycznych pozostawia nieregularną smugę (nekroza to przypadkowa śmierć komórki bez znaczników PCD).

Tapetum pylnikowe *Ornithogalum virens* było tkanką, gdzie po raz pierwszy zastosowano test kometkowy (w wersji neutralnej) do badania fizjologicznego procesu PCD u roślin i po raz pierwszy wykazano w tapetum nieprzypadkową fragmentację dwuniciowego nDNA (LEŚNIEWSKA i współaut. 1997, 2000; LEŚNIEWSKA 1999). Ujawniono też korelację pomiędzy stopniem zaawansowania cięcia DNA a postępującą kondensacją chromatyny (Ryc. 4 A1 i A2, B1 i B2, C1 i C2). W tapetum u tytoniu, *Nicotiana tabacum* i *Ornithogalum virens* (SIKORA 1998) alkaliczna wersja testu kometkowego, rejestrująca równocześnie cięcia pojedynczej i podwójnej nici nDNA, wykazała początek fragmentacji genomu w stadium wcześniejszym niż pęknięcia dwuniciowe. Porównanie wyników testu kometkowego z obrazem ultrastruktury jądra pozwoliło wyciągnąć wniosek, że jądra tapetum ze skondensowaną chromatyną są morfologicznym odbiciem daleko posuniętej molekularnej degradacji DNA, a nie jej początkowym etapem (LEŚNIEWSKA 1999). Test kometkowy zastosowano z powodzeniem w badaniach PCD także w innych tkankach roślinnych (LEŚNIEWSKA i współaut. 2000).

Do wykrywania fragmentacji nDNA typowej dla PCD w jądrach komórek *in situ* (na skrawkach) często stosuje się tzw. technikę TUNEL, w której wykorzystuje się zdolność terminalnej transferazy do włączania nukleotydów bez matrycy na wolnych 3'-OH końcach pociętej nici DNA. Podając znakowane nukleotydy można uwidoczniać miejsca przyłączenia ich do nici. Pozytywny wynik reakcji TUNEL uzyskano w tapetum i innych tkankach ściany pylnika u jęczmienia (*Hordeum vulgare*) podczas stadium późnej mikrospory (WANG i współaut. 1999), zarówno w pylnikach dojrzewających w sposób naturalny, jak i po szoku hiper-osmotycznym. Tą samą metodą wykryto w pylniku u sterylnej mutanta słonecznika (*Helianthus annuus*) wczesną fragmentację nDNA tylko w tapetum (stadium pachytenu) i fragmentację we wszystkich tkankach pylnika podczas fazy tetrad (BALK i LEAVER 2001). U *Or-*

nithogalum virens (SIKORA 1998) reakcja TUNEL dała pozytywny wynik w jądrach tapetum już na etapie mejocytów, na długo przed strukturalną degradacją protoplastów i kondensacją chromatyny, a więc w fazie wcześniejszej niż wskazywał na to test kometkowy. Wyniki testu kometkowego i metody TUNEL pokazują, że zmiany w chromatynie na poziomie

molekularnym pojawiają się dużo wcześniej przed zmianami strukturalnymi.

Istnieją jednak doniesienia, że technika *in situ* TUNEL może nie być w pełni specyficzna, gdyż nie odróżnia przypadkowo pociętego DNA od fragmentacji na oligonukleosomalne odcinki (BALK i LEAVER 2001), stąd zaleca się, by była stosowana równolegle z inną metodą.

CZY MITOCHONDRIA UCZESTNICZĄ W PCD TAPETUM ?

Od pewnego czasu wskazuje się na mitochondria jako ośrodek decyzyjny procesu programowanej śmierci komórki zarówno u zwierząt, jak i roślin (GRĄDZKA 2000, JONES 2000). W apoptozie zwierzęcej zależnej od mitochondriów kluczowym zdarzeniem jest uwolnienie z mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej do cytozolu specyficznych białek apoptogennych, w tym cytochromu *c*, aktywującego kaskadę kaspaz (proteaz cysteinowych). Przypuszczalnie cytochrom *c* może być czynnikiem uruchamiającym proces śmierci także w komórce roślinnej, a jego migrację z mitochondriów warunkuje wzrost poziomu wapnia, stres tlenowy i otwarcie megakanałów (ang. permeability transition pore, PT pore) (JONES 2000).

Przy użyciu metody immunolokalizacji *in situ* wykazano translokację cytochromu *c* do cytoplazmy w tapetum pylnikowym słonecznika (*Helianthus annuus*), w płodnych i sterylnych liniach, w obu przypadkach przed pojawieniem się cech morfologicznej degradacji tkanki (BALK i LEAVER 2001). W pylnikach sterylnych cytochrom *c* był uwalniany z mitochondriów tapetum w okresie pachytenu i został uznany za hipotetyczny czynnik wywołujący przedwczesną programowaną śmierć tej tkanki, potwierdzoną w reakcji TUNEL. Uderzające jest, że w cytoplazmie tapetum normalnych pylników słonecznika cytochrom *c* wykryto w stadium tetrad (odpowiednik Ryc. 2A), jeszcze przed właściwym dla tego gatunku różnicowaniem tkanki tapetalnej w formę plazmodium. Wyniki te rodzą wiele pytań. Czy procesy różnicowania i degradacji tapetum będą równoległe? Jak wcześniej pojawia się w tapetum sygnał śmierci i jakiej jest na-

tury? Czy cytochrom *c* jest rzeczywiście czynnikiem spustowym PCD w tapetum i w jaki sposób aktywuje ten proces, skoro nie wykryto u roślin typowej dla apoptozy kaskady kaspaz? Przypuszcza się, że uwolnienie cytochromu *c* może generować letalny poziom reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS), a funkcje kaspaz spełniają u roślin inne proteazy (patrz JONES 2000).

Nie ma pewności, czy uwalnianie cytochromu *c* podczas PCD tapetum i innych tkanek roślinnych jest regułą. Nie wykazano jego obecności w cytoplazmie starzejących się płatków u petunii, ale pojawiał się w cytozolu komórek roślinnych stymulowanych do PCD wysoką temperaturą, menadionem czy D-mannozą.

Podczas degradacji tapetum u niektórych gatunków obserwowano redukcję wewnętrznych błon mitochondrialnych (PACINI i współaut. 1986, PACINI i KEIJZER 1989). W starzejącym się tapetum *Ornithogalum virens* stwierdzono heterogeniczność populacji mitochondriów, dotyczącą zarówno ich ultrastruktury, jak i stanu potencjału transbłonowego (praca w przygotowaniu). Zmiany strukturalne obejmowały deformację kształtu mitochondriów, przejściowego powiększania się przestrzeni perimitochondrialnej i stopniowego wzrostu osmoofilności matriksu w końcowej fazie degradacji. Niezmienione mitochondria utrzymywały się do końca w tapetum u rzodkiewnika, *Arabidopsis thaliana* (FERREIRA i współaut. 1997), *Pinus sylvestris* (ROWLEY i współaut. 2000), *Tillandsia albida* i *Lobivia raushii* (PAPINI i współaut. 1999), co sugeruje, że mogą być one niezbędnymi organellami podczas aktywnego procesu PCD, wymagającego stałego dopływu energii.

ODKŁADANIE LIPIDÓW PODCZAS PCD TAPETUM

Szczególną cechą tapetum jest gromadzenie lipidów, rozpoczęte w metabolicznie aktywnej tkance i kontynuowane podczas jej degradacji. Lipidy, które wejdą w skład okrywy pyłkowej, odkładają się w plastydach i cytoplazmie. W syntezie lipidów cytoplazmatycznych może uczestniczyć zarówno ER szorstkie, obecne przez cały okres aktywności tapetum, jak i kompleksy gładkich błon, pojawiające się u niektórych gatunków wraz ze starzeniem się tkanki tapetalnej. Rosnąca liczba lipidowych plastoglobul jest oznaką degradacji plastydów i ich przejścia w formę elajoplastów (CLÉMENT i PACINI 2001, LEŚNIEWSKA i CHARZYŃSKA 2000).

Ostatecznie dochodzi do fuzji plastoglobul z lipidami cytoplazmatycznymi.

Przed rozpadem komórek tapetum zanika ER, podlegając wcześniej fragmentacji na pęcherzyki. Zanika także aparat Golgiego, a cytoplazma w miarę starzenia tapetum obkurcza się i zagęszcza. Cały protoplast przechodzi głębokie zmiany, które mają na celu przekształcenie wszystkich jego elementów w użyteczne składniki soku pylnikowego i materiały okrywy pyłkowej. Przerwanie ciągłości błony plazmatycznej uwalnia pozostałości tapetalnych protoplastów pomiędzy ziarna pyłku.

CZY POZOSTAŁOŚCI CYTOPLAZMY TAPETUM SĄ ODPOWIEDNIKIEM CIAŁEK APOPTOTYCZNYCH ?

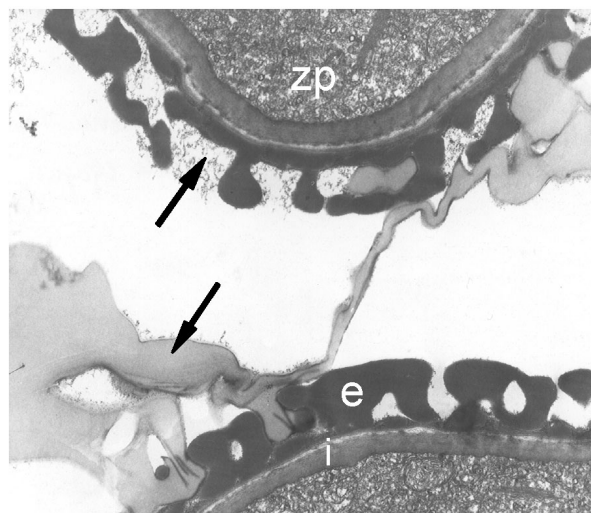
W momencie rozpadu tapetum do komory pylnika przemieszczają się masy lipidów i zmienione, niewielkie fragmenty protoplastu. Brak błony komórkowej i zmiany w organelach odróżniają je zasadniczo od ciałek apoptotycznych, charakterystycznych dla apoptozy zwierzęcej. Ciała apoptotyczne zawierają fragmenty jądra i zagęszczonej cytoplazmy

oraz prawie niezmienione strukturalnie organelle, a obecność błony komórkowej z fosfatydylseryną na powierzchni czyni takie struktury rozpoznawalnymi przez wchłaniające je makrofagi. W organizmach roślinnych nie ma odpowiedników makrofagów ani zjawiska fagocytozy, którą uniemożliwia obecność ścian komórkowych.

CZY SKŁADNIKI OKRYWY PYŁKOWEJ SĄ TYLKO PRODUKTAMI ROZPADU TAPETUM?

Śmierć tapetum nie może być rozpatrywana w kategoriach usuwania zbędnej tkanki, która po spełnieniu funkcji sekrecyjnych w pylniku kończy swoje zadanie. Wiele produktów tapetalnego pochodzenia odegra swoją właściwą biologiczną rolę dopiero po zaniku tapetum. Są wśród nich orbikule (ciała Ubi-scha) ułatwiające pyłkowi oderwanie się od ściany pylnika i specjalne struktury łączące ze sobą dojrzałe ziarna pyłku. Kluczowe znaczenie dla męskiego gametofitu ma białkowo-lipidowa okrywa pyłkowa (Ryc. 5), która podnosi efektywność zapylania, chroni pyłek przed niekorzystnymi warunkami środowiska, a przede wszystkim zapewnia mu sukces reprodukcyjny podczas konkurencyjnego kiełkowania w tkankach słupka.

Dokładne analizy wykazały, że składniki warstwy powierzchniowej okrywy pyłkowej i zawartość zagłębień egzyny u tego samego gatunku mogą się istotnie różnić. Wskazuje to na nieprzypadkowy sposób osadzania różnych frakcji w określonym miejscu ściany ziarna



Ryc. 5. Powłoka pyłkowa (strzałki) na powierzchni i w zagłębieniach ściany ziaren pyłku (zp) *Ornithogalum virens*; e – egzyna, i – intyna. TEM. Pow. 7000x.

pyłku. Przypuszcza się, że pewne białka pochodzenia tapetalnego są deponowane wcześniej na egzynie i pełnią po rozpadzie tapetum rolę kotwic dla lipidowych materiałów (PIFFANELLI i współaut. 1998). Nowe spojrzenie na interakcje między tapetum a dojrzewającym pyłkiem dały badania okrywy pyłkowej u Brassicaceae (FERREIRA i współaut. 1997, PIFFANELLI i MURPHY 1998, PIFFANELLI i współaut. 1998). U rzepaku, *Brassica napus*, wykazano, że wchodzące w skład okrywy pyłkowej białka i lipidy nie są biernie przeniesionymi składnikami rozpadu tapetum. Źródłem tych substancji są powstające w końcowej fazie różnicowania tapetum tzw. tapetosomy, czyli ciała lipidowo-białkowe o własnościach osmotycznych, nie ograniczone elektronowogęstą błoną i posiadające wewnątrz lipidowego obszaru oleozy-no-podobne białka tworzące regularną, heksagonalną sieć. Zdaniem badaczy tapetosomy przechodzą transformację podczas rozpadu tapetum i przenoszenia ich na powierzchnię

pyłku. Białka oleozyn są cięte przez endoproteazy, co usuwa z nich N-terminalną domenę hydrofobową (odpowiedzialną za utrzymywanie integralności tapetosomów), a z C-terminalnej domeny formowane są wysoce zasadowe polipeptydy, w tym białka związane z samoniezgodnością. Równoczesna modyfikacja lipidów sprawia, że skład powłoki pyłku różni się od substancji znajdujących się w żywych protoplastach. Należy szczególnie podkreślić, że uruchamianie enzymów tnących składniki tapetum na składowe powłoki pyłkowej dokonuje się w fazie rozpadu tkanki tapetalnej, jako rezultat rozwojowo regulowanej sekwencji przemian związanych z działalnością tapetum. Nie wiadomo czy występowanie tapetosomów ogranicza się tylko do rodziny Brassicaceae, gdzie zostały opisane i czy podobnym transformacjom podlegają tapetalne składniki podczas tworzenia okrywy pyłkowej u innych gatunków.

JAK PRZEBIEGA INDUKCJA PCD W TAPETUM ?

Obecnie brak danych o sygnałach inicjujących PCD w tapetum pylnikowym, chociaż można przypuszczać, że kontrolowany genetycznie proces naturalnej śmierci może być regulowany hormonalnie. O losie tkanek roślinnych decyduje zarówno ich położenie w organie, jak i sygnały docierające z komórek sąsiednich.

Sugeruje się, że wskaźnikami wczesnej fazy PCD u roślin mogą być także arabinogalaktanoproteidy (ang. arabinogalactan proteins, AGPs). Rodzinie tych glikoprotein przypisuje się rolę specyficznych znaczników powierzchni komórek, determinujących kierunek ich różnicowania, ze śmiercią programowaną włącznie (SCHINDLER i współaut. 1995, GASPAR i współaut. 2001). Zmiany w AGPs błon lub matriks zewnątrzkomórkowej (ścianie komórkowej) mogą być przyczyną zmian interakcji międzykomórkowych i zainicjować wejście komórek na drogę programowanej śmierci. Zmiany w

składzie AGPs wykazano podczas rozwoju pylnika *Brassica napus* (PENNEL i współaut. 1991). Obecność specyficznych glikoprotein wykazano przejściowo w błonie komórkowej tapetum i innych komórek pylnika, w kolejności: tapetum, tetrady mikrospor, warstwa pośrednia, endoteczum. Pojawienie się specyficznych glikoprotein błonowych poprzedzało zmiany w ścianie tych komórek. Na podstawie powyższych wyników BELL (1996) wysunął hipotezę, że AGPs zanikające z powierzchni komórek tapetum mogą ulegać fragmentacji, a ich cukrowe fragmenty działać jak sygnały przetrwania, tłumiące ekspresję genów apoptotycznych w komorze pylnika. Tym, według Bell'a, można by tłumaczyć przeżywanie wszystkich pomejotycznych mikrospor w pylnikach nasiennych, w przeciwieństwie do megaspor, w większości genetycznie zdeterminowanych do zamierania i nie chronionych przez tkankę podobną do tapetum pylnikowego.

PODSUMOWANIE

Nie ulega wątpliwości, że naturalna śmierć tapetum jest procesem zaprogramowanym w ontogenezie pylnika, chociaż mechanizmy jego regulacji są prawie zupełnie nieznane. Nie wiadomo jakie bodźce inicjują

PCD tapetum, ani jaki czynnik spustowy i w jakich warunkach uruchamia molekularną maszynę destrukcji. Potwierdzonym faktem jest nieprzypadkowa fragmentacja jądrowego DNA. Najwięcej danych w literaturze

dotyczy strukturalnej degradacji tkanki, ale wiele pytań pozostaje bez odpowiedzi. Destrukcja organelli przebiega w sposób uporządkowany i wykluczający niekontrolowaną autolizę, ale trudno na razie wskazać uniwersalną sekwencję zmian w protoplastach. Nieznany jest przebieg dewakuolizacji tapetum, nie wiadomo też w jakim stopniu zjawisko autofagii odgrywa rolę w degradacji tkanki. Należałoby wyjaśnić, czy w procesie proteolizy w komórkach tapetum są zaangażowane proteasomy (wielokatalityczne kompleksy proteinazowe).

Wyniki prac nad degradacją tapetum *Ornithogalum virens* i *Helianthus annuus* wskazują, że molekularne mechanizmy śmierci zostają włączone w fazie pełnej aktywności ko-

mórek tapetum, kiedy morfologia wszystkich organelli komórkowych, także jądra, nie wykazuje jeszcze oznak destrukcji.

Celem procesu różnicowania i programowanej śmierci komórek tapetum jest funkcjonowanie na rzecz rozwijających się ziaren pyłku i stopniowe przegrupowanie strukturalne organelli, angażujące układy enzymatyczne komórki, niektóre uaktywniane już po zaniku komórkowej organizacji. Zmiany te decydują o dalszej funkcji tapetum w postaci powłoki pyłkowej, aktywnie oddziałującej ze środowiskiem kiełkowania pyłku.

Serdecznie dziękuję Pani prof. Marii Charzyńskiej za cenne uwagi.

ANTHER TAPETUM IN PROGRAMMED CELL DEATH

S u m m a r y

The death of the tapetum in normal anther development is an example of physiological programmed cell death (PCD) in floral organ of higher plants. This sporophytic secretory tissue which surrounds meiocytes/pollen grains, provides them with many substances necessary for development, e.g. nutrients, certain enzymes, precursors of the pollen exine and materials of pollen coat including the signalling molecules. Species specific program of tapetal cells differentiation and disintegration coincides precisely with developmental program of the male postmeiotic cell line. Premature or delayed degradation of the tapetum results in male sterility. The death of tapetum, coordinated with death of several different tissues, is indispensable in realization of anther dehiscence programme and in release of mature pollen grains.

PCD of tapetum is genetically controlled, but its molecular mechanisms are poorly known with the ex-

ception of internucleosomal cleavage of nuclear DNA.

At the structural level, programmed death of tapetum is realized by sequential elimination of all the cellular structures (extracellular matrix = cell wall and protoplast). The cell wall hydrolysis takes place long before disintegration of tapetal protoplast.

The morphotype of the anther in tapetum PCD is different from apoptosis and autolysis. Cytomorphological changes in tapetum include: general shrinkage of the whole cells and nuclei, chromatin condensation (specially at the nucleus periphery), transformation of tapetal plastids into elaioplasts, accumulation of lipids in cytoplasm, disruption of endoplasmic reticulum and other organelles, and eventually the breakdown of the plasma membrane accompanied by the release of changed tapetal remnants, transformed, in turn, into pollen coat materials.

LITERATURA

- BALK J., LEAVER C. J., 2001. *The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release*. Plant Cell 13, 1803–1818.
- BEERS E. P., 1997. *Programmed cell death during plant growth and development*. Cell Death Differ. 4, 649–661.
- BEDINGER P., 1992. *The remarkable biology of pollen*. Plant Cell 4, 879–887.
- BELL P. R., 1996. *Megaspore abortion: a consequence of selective apoptosis?* Int. J. Plant Sci. 157, 1–7.
- BHANDARI N. N., 1984. *Microsporangium*. [W:] *Embryology of Angiosperms*. JOHRI B. M. (red.) Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 60–88.
- CHARZYŃSKA M., 1997. *Programmed cell death of the anther tapetum – a requirement for the normal development of male germ line in higher plants*. Acta Biol. Cracov. 39 (Suppl. 1) 1.
- CLÉMENT C., PACINI E., 2001. *Anther plastids in Angiosperms*. Bot. Rev. 67, 54–73.
- DANON A., DELORME V., MAILHAC N., GALLOIS P., 2000. *Plant programmed cell death: A common way to die*. Plant Physiol. Biochem. 38, 647–655.
- Ferreira M.A., DE ALMEIDA ENGLER J., MIGUENS F.C., VAN MONTAGU M., ENGLER G., DE OLIVEIRA D. E., 1997. *Oleosin gene expression in Arabidopsis thaliana tapetum coincides with accumulation of lipids in plastids and cytoplasmic bodies*. Plant Physiol. Biochem. 35, 729–739.
- FUKUDA H., 1996. *Xylogenesis: initiation, progression and cell death*. Ann. Rev. Plant Mol. Biol. 47, 299–325.

- FUKUDA H., WATANABE Y., KURIYAMA H., AOYAGI S., SUGIYAMA M., YAMAMOTO R., DEMURA T., MINAMI A., 1998. *Programming of cell death during xylogenesis*. J. Plant Res. 111, 253–256.
- GASPAR Y., JOHNSON K. L., MCKENNA J. A., BACIC A., SCHULTZ C. J., 2001. *The complex structures of arabinogalactan- proteins and the journey towards understanding function*. Plant Mol. Biol. 47, 161–176.
- GREENBERG J. T., 1996. *Programmed cell death: A way of life for plants*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93, 12094–12097.
- GOLDBERG R. B., BEALS T. P., SANDERS P. M., 1993. *Anther development: basic principles and practical applications*. Plant Cell 5, 1217–1229.
- GRADZKA I., 2000. *Apoptoza: decyzja należy do mitochondriów*. Post. Bioch. 46, 2–16.
- HAVEL L., DURZAN D. J., 1996. *Apoptosis in plants*. Bot. Acta 109, 268–277.
- HAVEL L., DURZAN D. J., 1999. *Programmed cell death in plant development*. Adv. Regul. Plant Growth Develop., 203–212.
- HESS M.W., HESSE M., 1994. *Ultrastructural observations on anther tapetum development of freeze-fixed Ledebouria socialis Roth (Hyacinthaceae)*. Planta 192, 421–430.
- HESSE M., HESS M. W., 1993. *Recent trends in tapetum research. A cytological and methodological review*. Plant Syst. Evol. (Suppl. 7), 127–145.
- HOEBERICHTS F. A., WOLTERING E. J., 2002. *Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators*. BioEssays 25, 47–57.
- JACKOWSKI G., 1997. *Programowana śmierć komórka u roślin i zwierząt*. Wszechświat 98, 216–219.
- JAŁOSZYŃSKI P., KUJAWSKI M., SZYFTER K., 1996. *Elektroforeza pojedynczych komórek (comet assay) – użyteczna technika badania uszkodzeń DNA*. Post. Biol. Kom. 23, 339–354.
- JONES A., 2000. *Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death?* Trends Plant Sci. 5, 225–230.
- JONES A., 2001. *Programmed cell death in development and defense*. Plant Physiol. 125, 94–97.
- KAPOOR S., KOBAYASHI A., TAKATSUJI H., 2002. *Silencing of the tapetum-specific zinc finger gene TAZ1 causes premature degeneration of tapetum and pollen abortion in Petunia*. Plant Cell 14, 2353–2367.
- KERR J. F., WYLLIE A. H., CURRIE A. R., 1972. *Apoptosis: a basic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br. J. Cancer 26, 239–257.
- KOLTUNOW A. M., TRUETTNER J., COX K. H., WALLROTH M., GOLDBERG R. B., 1990. *Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development*. Plant Cell 2, 1201–1224.
- LEŚNIEWSKA J., 1996. *Ultrastructural aspects of nuclei degeneration during programmed cell death of tapetum in Ornithogalum virens*. Folia Histochem. Cytobiol. 34 (Suppl. 2), 60.
- LEŚNIEWSKA J., 1999. *Differentiation and programmed cell death of the secretory tapetum of Ornithogalum virens*. Rozprawa doktorska, Uniwersytet Warszawski 1–91.
- LEŚNIEWSKA J., GRADZKA I., SZUMIEL I., CHARZYŃSKA M., 1997. *PCD-related DNA degradation in the nuclei of anther tapetum identified by the comet assay*. XXII. Conference of Embryology. Kraków-Osieciany
- LEŚNIEWSKA J., CHARZYŃSKA M., 2000. *Tapetal plastids in Ornithogalum virens: from meristematic stage to pollen coat*. Acta Biol. Cracov. Series Bot. 42, 141–149.
- LEŚNIEWSKA J., SIMEONOVA E., SIKORA A., MOSTOWSKA A., CHARZYŃSKA M., 2000. *Application of the comet assay in studies of programmed cell death (PCD) in plants*. Acta Soc. Bot. Pol. 69, 101–107.
- LEŚNIEWSKA J., SIMEONOVA E., CHARZYŃSKA M., 2003. *Subcellular heterogeneity of mitochondrial membrane potential in anther tapetum*. IX International Conference on Plant Embryology. Brno 1–3.09. 2003, Czech Republic.
- MARIANI C., BEUCKELEER D., TRUETTNER J., LEEMANS J., GOLDBERG R. G., 1990. *Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene*. Nature 347, 737–741.
- MURGIA M., CHARZYŃSKA M., ROUGIER M., CRESTI M., 1991. *Secretory tapetum of Brassica oleracea L.: polarity and ultrastructural features*. Sex. Plant Reprod. 4, 28–35.
- PACINI E., 1990. *Tapetum and microspore function*. [W:] Microspores: evolution and ontogeny. BLACKMORE S., KNOX R. B. (red.). Academic Press, San Diego, 213–237.
- PACINI E., BELLANI L.M., LOZZI R., 1986. *Pollen, tapetum and anther development in two cultivars of sweet cherry (Prunus avium)*. Phytomorphology 36, 197–210.
- PACINI E., CASADORO G., 1981. *Tapetum plastids of Olea europaea L.* Protoplasma 106, 289–296.
- PACINI E., FRANCHI G. G., HESSE M., 1985. *The tapetum: its form, function and possible phylogeny in Embryophyta*. Plant Syst. Evol. 149, 155–185.
- PACINI E., KEIJZER C. J., 1989. *Ontogeny of intruding non-periplasmic tapetum in the wild chicory, Cichorium intybus (Compositae)*. Plant Syst. Evol. 167, 149–164.
- PAPINI A., MOSTI S., BRIGHIGNA L., 1999. *Programmed-cell-death events during tapetum development of angiosperms*. Protoplasma 207, 213–221.
- PARKINSON B. M., PACINI E., 1995. *A comparison of tapetal structure and function in pteridophytes and angiosperms*. Plant Syst. Evol. 198, 55–88.
- PENNELL R. I., JANNICHE L., KJELLBOM P., SCOFIELD G. N., PEART J. M., ROBERTS K., 1991. *Developmental regulation of a plasma membrane arabinogalactan protein epitope in oilseed rape flowers*. Plant Cell 3, 1317–1326.
- PIFFANELLI P., MURPHY D. J., 1998. *Novel organelles and targeting mechanisms in the anther tapetum*. Trends Plant Sci. 3, 250–253.
- PIFFANELLI P., ROSS J. H. E., MURPHY D. J., 1998. *Biogenesis and function of the lipid structures of pollen grains*. Sex. Plant Reprod. 11, 65–80.
- ROSS J. H. E., MILANESI C., MURPHY D. J., CRESTI M., 2000. *Rapid-freeze fixation and substitution improves tissue preservation of microspores and tapetum*

- in *Brassica napus*. Sex. Plant Reprod. 12, 237–240.
- ROWLEY J. R., 1993. *Cycles of hyperactivity in tapetal cells*. Plant Syst. Evol. (Suppl. 7), 23–37.
- ROWLEY J. R., SKVARLA J. J., WALLS B., 2000. *Microsporogenesis in Pinus sylvestris L. VIII. Tapetal and late pollen grain development*. Plant Syst. Evol. 225, 201–224.
- SANTOS R. P., MARIATH J. E. A., HESSE M., 2003. *Pollenkitt formation in Ilex paraguariensis A.St.Hil. (Aquifoliaceae)*. Plant Syst. Evol. 237, 185–198.
- SCHRAUWEN J. A. M., METTENMEYER T., CROES A. F., WULLEMS G. J., 1996. *Tapetum-specific genes: what role do they play in male gametophyte development?* Acta Bot. Neerl. 45, 1–15.
- SCHINDLER T., BERGFELD R., SCHOPFER P., 1995. *Arabino-galactan proteins in maize coleoptiles: developmental relationship to cell death during xylem differentiation but not to extension growth*. Plant J. 7, 25–36.
- SIKORA A., 1998. *Zmiany struktury DNA jądrowego podczas różnicowania i programowanej śmierci komórek roślinnych*. Praca magisterska, Uniwersytet Warszawski.
- STEER M. W., 1977. *Differentiation of the tapetum in Avena. II. The endoplasmic reticulum and Golgi apparatus*. J. Cell Sci. 28, 71–86.
- SUZUKI K., TAKEDA H., TSUKAGUCHI T., EGAWA Y., 2001. *Ultrastructural study on degeneration of tapetum in anther of snap bean (Phaseolus vulgaris L.) under heat stress*. Sex. Plant Reprod. 13, 293–299.
- WANG M., HOEKSTRA S., VAN BERGEN S., LAMERS G. E. M., OPPEDIJK B. J., VAN DER HEIJDEN M. W., DE PRIESTER W., SCHILPEROORT R. A., 1999. *Apoptosis in developing anthers and the role of ABA in this process during androgenesis in Hordeum vulgare L.* Plant Mol. Biol. 39, 489–501.
- WANG M., MAARASCHIN S. F., BERECKI G., BRUIN W., DUIJN B., KORTHOUT H. A. A. J., 2001. *Cell suicide in plants by proteinase activity and PCD in developing anther of barley*. Proceedings of X. International Conference on Plant Embryology, Nitra (Slovakia), 121.
- WEBER M., 1992. *The formation of pollenkitt in Apium nodiflorum (Apiaceae)*. Ann. Bot. 70, 573–577.
- WIDŁAK P., 2002. *Mechanizmy fragmentacji DNA i kondensacji chromatyny w komórkach ulegających apoptozie*. Post. Biol. Kom. 27, 583–597.
- WORRALL D., HIRD D. L., HODGE R., PAUL W., DRAPER J., SCOTT R., 1992. *Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco*. Plant Cell 4, 759–771.