

RENATA ŚNIEŻKO i BARBARA CHUDZIK

Zakład Biologii Komórki

Instytut Biologii

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

Akademicka 19, 20-033 Lublin

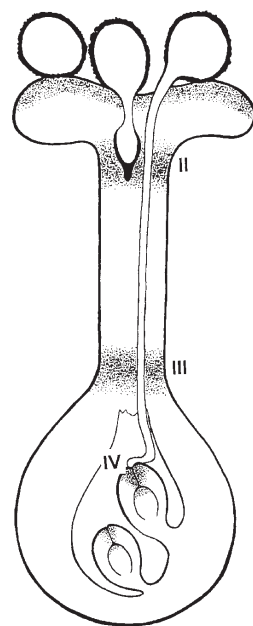
e-mail: cellbiol@biotop.umcs.lublin.pl

ZALĄŻEK JAKO AKTYWNY PARTNER W PROCESIE ROZMNAŻANIA GENERATYWNEGO ROŚLIN KWIATOWYCH

WSTĘP

Płodność roślin rozmnażających się seksualnie zależy od pomyślnego przebiegu fazy progamicznej (okres od umieszczenia pyłku na znamieniu słupka do penetracji zalążka przez łagiewkę pyłkową) i efektywnego zapłodnienia. Są to procesy, które warunkują wysokość plonu owoców lub nasion, mają więc duże znaczenie praktyczne. Podczas fazy progamicznej dochodzi do wzajemnych oddziaływań między gametofitem męskim (pyłkiem i łagiewką pyłkową) a tkankami słupka – zarówno somatycznymi, jak i komórkami linii generatywnej. Znamię, szyjka słupka i tkanki łożyska w zalążni leżą na drodze wzrostu łagiewki, kierującej się do zalążka i ukrytego w nim woreczka zalążkowego (Ryc. 1). Zalązek jest organem, który wchodzi w interakcję z łagiewką pyłkową pod koniec jej drogi wzrostu, bezpośrednio przed zapłodnieniem.

W zalążni wzrost łagiewki pyłkowej powinien być ukierunkowany do mikropyle płodnego zalążka. U wielu roślin zaobserwowano, że łagiewki pyłkowe reagują na obecność receptywnych zalążków zmianą kierunku wzrostu ku ich mikropyle (okienku), nie reagują natomiast na zalążki niereceptywne, np. nie zawierające woreczka zalążkowego, zbyt młode lub za długo oczekujące na zapłodnienie. Obserwacje te wskazują na aktywną rolę zalążka, jako partnera w procesie rozmnażania seksua-



Ryc. 1. Droga łagiewki pyłkowej w tkankach słupka; zaznaczone najważniejsze miejsca interakcji międzykomórkowych: I – na znamieniu, II – w tkance podznamieniowej, III – w szyjce słupka, IV – w mikropyle zalążka.

lnego i sugerują przywabianie łagiewek przez płodne, receptywne zalążki. Zalążki stają się receptywne w ściśle określonym etapie rozwoju, dlatego też ważne jest poznanie procesów zachodzących podczas dojrzewania zarówno w

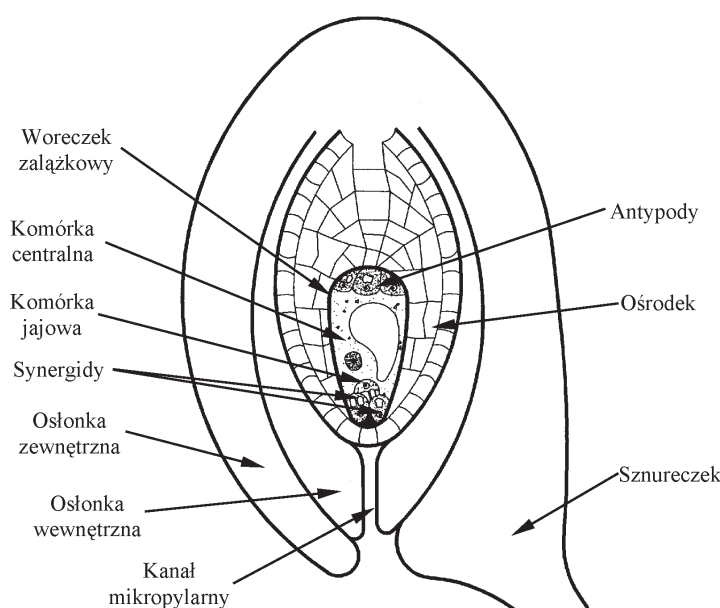
komórkach linii generatywnej, jak i w somatycznych. Dotychczas nie poznano dokładnie, w jaki sposób zalążki przekazują łagiewkom sygnały o swojej receptywności. Problem ten jest intensywnie badany w kilku laboratoriach na

świecie i stanowi także obiekt badań prowadzonych w Lublinie przez autorki niniejszego artykułu.

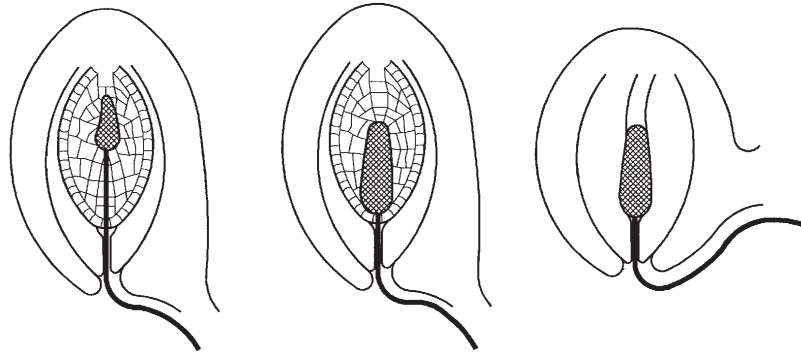
ROZWÓJ ZALĄŻKA

Zalążek jest organem zbudowanym z somatycznych komórek rośliny macierzystej, w którym rozwija się żeński gametofit, czyli woreczek zalążkowy. Rozwój gametofitu żeńskiego jest kontynuacją procesów wyróżnicowania komórek linii generatywnej z tkanek somatycznych zalążka. Następuje to stosunkowo wcześnie, kiedy zalążek przekształca się ze wzgórka merystematycznego w primordium z zaczątkami osłonek i grupą komórek stanowiących ośrodek. W tym wczesnym, nadal rozrastającym się ośrodku, komórki położone na jego szczycie pod skórą stają się komórkami archesporialnymi (macierzystymi komórek mejotycznych). Dalszy rozwój gametofitu może przebiegać nieco różnie, zależnie od gatunku rośliny, jednak u przeszło 80% roślin kwiatowych proces ten jest bardzo podobny. Najczęściej tylko jedna komórka różnicuje się w mejocyt, który dzieli się na cztery megaspory. Tylko jedna z megaspor rozwija się w woreczek zalążkowy. Najczęściej zbudowany jest on z 7 komórek: 2 synergidy i komórka jajowa tworzą aparat jajowy, poza nimi jest duża komórka centralna i trzy antypody o charakterze

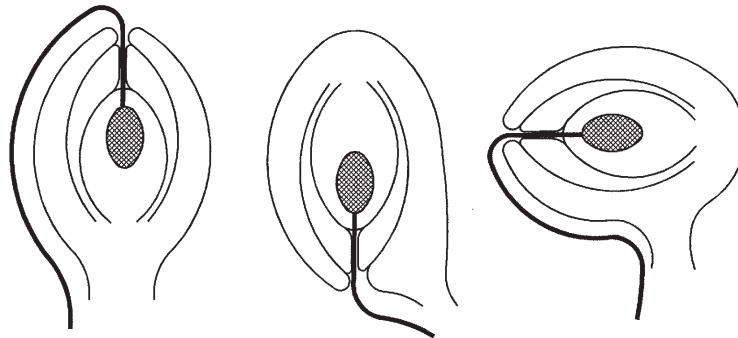
wegetatywnym (Ryc. 2). Woreczek zalążkowy zlokalizowany jest w tkance somatycznej ośrodka, która może być różnie zbudowana, w zależności od typu anatomicznego zalążka (Ryc. 3). Osłonki okrywają ośrodek i wystają na szczycie formując mikropyle. Od mikropyle do ośrodka prowadzi kanał mikropylarny – wąska przestrzeń utworzona przez szczytową część osłonki wewnętrznej, niekiedy także zewnętrznej. Mikropyle może być skierowane: do łożyska, w położeniu odwrotnym lub bocznym (Ryc. 4). Łagiewka pyłkowa wrasta do zalążka przez mikropyle, rośnie poprzez kanał mikropylarny utworzony ze szczytowej części osłonki, dalej, pomiędzy komórkami ośrodka, do woreczka zalążkowego. Następnie łagiewka penetruje do woreczka zalążkowego przez jedną z synergid i uwalnia swoją cytoplazmę z dwiema komórkami plemnikowymi, niszcząc równocześnie tę synergidę. Jedna z komórek plemnikowych zapładnia komórkę jajową, zaś druga komórkę centralną – jest to fenomen podwójnego zapłodnienia występujący u roślin okrytonasiennych. Część mikropylarna zalążka stanowi zatem końcowy odcinek drogi łagiew-



Ryc. 2. Schematyczny rysunek typowego zalążka cienkoosrodkowego.



Ryc. 3. Droga łagiewki pyłkowej w zalążkach: A – gruboośrodkowych, B – cienkoośrodkowych, C – pozbawionych ośrodka mikropylarnego.



Ryc. 4. Droga łagiewki pyłkowej w zalążkach: A – ortotropowych, B – anatropowych, C – kampylotropowych.

ki pyłkowej do woreczka zalążkowego i prawidłowy rozwój tkanek w tym miejscu jest jed-

nym z ważnych czynników decydujących o zapłodnieniu.

DOJRZEWANIE MIKROPYLARNEGO BIEGUNA ZALĄŻKA DO STANU RECEPTYWNOŚCI

Po morfologicznym wykształceniu woreczka zalążkowego, obserwuje się proces dojrzewania tkanek somatycznych leżących na mikropylarnym biegunie zalążka. W zalążkach roślin z rodziny Brassicaceae komórki mikropylarnej części ośrodka ulegają całkowitej degeneracji tak, że w stadium receptywnym woreczek zalążkowy styka się bezpośrednio z kanałem mikropylarnym, utworzonym przez osłonki. W zalążkach cienkoośrodkowych, w których pomiędzy woreczkiem zalążkowym a kanałem mikropylarnym znajduje się pojedyncza warstwa komórek ośrodka, tylko niektóre z nich ulegają degeneracji. W miejscach po zdegenerowanych komórkach powstają duże przestrzenie, wypełnione substancją zewnątrzkomórkową zawierającą, między innymi, liczne ziarna skrobi. W zalążkach gruboośrodkowych, w których pomiędzy woreczkiem zalążkowym i kanałem mikropylarnym znajduje się kilkanaście warstw komórek ośrodka, nie

obserwuje się przejawów degeneracji. Komórki leżące na drodze wzrostu łagiewki pyłkowej wykazują charakter wydzielniczy. Podobnie, komórki skórki okrywającej mikropylarny biegun środka tracą charakter okrywający, stają się wyjątkowo duże, mają gęstą cytoplazmę, a kutikula pokrywająca ich ściany jest w wielu miejscach poprzerywana (CHUDZIK 2002).

Uniwersalnym przejawem uzyskiwania dojrzałości przez tkanki mikropylarnej części zalążków, u różnych gatunków roślin, jest nasilenie aktywności wydzielniczej komórek somatycznych i linii generatywnej. Przejawem tego procesu jest wypełnienie przestrzeni międzykomórkowych wydzieliną zewnątrzkomórkową. Przestrzenie międzykomórkowe z zawartą w nich wydzieliną i ściany komórkowe określane są łącznie jako macierz zewnątrzkomórkowa roślinna (ang. extracellular matrix, ECM). Właśnie w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej tkanek słupka odbywa

się wzrost łagiewek pyłkowych. Wydzieliny w mikropylarnej części zalążka zostały wykryte u prosa (*Paspalum* sp.) (CHAO 1971), śniedka (*Ornithogalum caudatum*) (TILTON 1979), buraka (*Beta vulgaris*) (OLESEN i BRUUN 1990), aloesika (*Gasteria verrucosa*) (FRANSSEN-VERHEIJEN i WILLEMSE 1993), brzoskwini (*Prunus persica*) (HERRERO 2000), rzepaku (*Brassica napus*), gorczycy (*Sinapis alba*), hiacynta (*Galtonia candicans*), wiesiołka (*Oenothera hookeri*), i przebiśniegu (*Galanthus nivalis*) (CHUDZIK i ŚNIEŻKO 1997, 1999a, b, 2003; CHUDZIK 2002). Pojawianie się wydzieliny zewnątrzkomórkowej w mikropyle zalążka związane jest zawsze z określoną fazą rozwojową kwiatu i uważa się, że jest ono przejawem dojrzałości i płodności zalążka. Powiększenie przestrzeni międzykomórkowych i gromadzenie w nich wydzieliny służy przygotowaniu odpowiedniego środowiska wzrostu dla łagiewki.

SKŁADNIKI WYDZIELINY MIKROPYLARNEJ, WAŻNE DLA WZROSTU ŁAGIEWKI PYŁKOWEJ

Skład biochemiczny wydzieliny mikropylarnej badany był u roślin z rodzin Amaryllidaceae, Brassicaceae, Liliaceae i Oenotheraceae (CHUDZIK i ŚNIEŻKO 1997, 1999a, b, 2003). Wiadomo, że w wydzielinie występuje m.in. dużo pektyn, glikoprotein i wolnych jonów wapnia.

Pektyny

Metody immunocytochemiczne pozwoliły stwierdzić, że pula pektyn występujących w obszarze apoplastu zalążków, składa się z frakcji pektyn estryfikowanych i deestryfikowanych. W bardzo małych ilościach występują one w ścianach komórkowych w całej tkance somatycznej zalążka, ale znaczące ilości tych związków pojawiają się dopiero podczas fazy progamicznej w rejonie mikropylarnym płodnych zalążków. Po inkubacji z przeciwciałem JIM 7 – rozpoznającym pektyny estryfikowane, intensywność fluorescencji na biegunie mikropylarnym zalążków była o wiele silniejsza niż na biegunie chalazalnym. Zastosowanie przeciwciał znakowanych cząsteczkami złota pozwoliło stwierdzić, że pektyny estryfikowane występują w rejonie mikropylarnym zalążków zarówno w pogrubionych ścianach komórkowych, jak i w przestrzeniach między-

komórkowych. Są one również wykrywane na terenie cytoplazmy komórek, równocześnie obserwuje się proces ich aktywnego wydzielania poza komórkę. Na biegunie chalazalnym zalążka pektyny rozpoznawane przez przeciwciało monoklonalne JIM 7 występują w niewielkich ilościach w ścianach komórkowych, ale nie obserwuje się nasilonego procesu egzocytozy.

W tkankach rejonu mikropylarnego, obserwowano również nagromadzenie pektyn deestryfikowanych (rozpoznawanych przez przeciwciało monoklonalne JIM 5). Badania immunocytochemiczne przeprowadzone na poziomie mikroskopu elektronowego wykazały, że pektyny deestryfikowane w rejonie mikropylarnym zalążków są zlokalizowane przede wszystkim w wydzielinie zewnątrzkomórkowej, w której odbywa się wzrost łagiewek pyłkowych. Nie są natomiast wykrywane w ścianach komórkowych, ani na terenie cytoplazmy komórek. W pozostałych częściach zalążka niewielkie ilości tych pektyn występują głównie w narożach ścian komórkowych, gdzie są prawdopodobnie odpowiedzialne za spójność tkanki. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, silnie estryfikowane pektyny są syntetyzowane w aparacie Golgiego i w takiej formie są wydzielane na powierzchnię komórki. W obrębie apoplastu pektyny mogą, w sposób kontrolowany, podlegać deestryfikacji, przez obecne tam wyspecjalizowane esterazy (CARPITA i GIBEAUT 1993).

Funkcją pektyn, obecnych w macierzy zewnątrzkomórkowej tkanek słupka i mikropylarnej części zalążków, jest utworzenie uwodnionej matrix, będącej optymalnym środowiskiem wzrostu dla łagiewek pyłkowych. Są one również źródłem składników odżywczych i materiałów budulcowych. Łagiewki pyłkowe produkują wiele enzymów oddziałujących z pektynami. Są wśród nich poligalakturonazy, esterazy i liazy pektynowe. Poligalakturonazy wydzielane do ECM słupka w czasie wzrostu łagiewki częściowo degradują pektyny. Ułatwia to penetrację łagiewki, ponieważ struktura ECM zostaje rozluźniona. Produkty degradacji pektyn z apoplastu zalążka stają się prekursorami do syntezy ściany komórkowej łagiewki. Powstające w wyniku degradacji pektyn cząsteczki oligogalakturonianów mogą działać jak cząsteczki sygnałne, podobnie jak oligosacharyny (FRY i współaut. 1993). Inne enzymy mogą zmieniać strukturę pektyn obecnych w ECM słupka tak, aby

pełniły one funkcje cząsteczek adhezyjnych dla łagiewki. W literaturze istnieje wiele danych świadczących o zaangażowaniu pektyn w adhezję komórek. Jednak rodzaj cząsteczek pektynowych zaangażowanych w te procesy różni się w zależności od badanego gatunku oraz tkanki. Najnowsze doniesienia wskazują, że pektyny deestryfikowane, rozpoznawane przez przeciwciała monoklonalne JIM 5, są konieczne dla rosnących łagiewek pyłkowych *Lilium longiflorum* jako cząsteczki adhezyjne, umożliwiające przyleganie do macierzy zewnątrzkomórkowej słupka (MOLLET i współaut. 2000). Do adhezji łagiewek pyłkowych lilii (*L. longiflorum*), oprócz pektyn, potrzebne jest jeszcze niskocząsteczkowe, zasadowe białko o masie cząsteczkowej 9 kD, określane jako adhezyna (SCA) (PARK i współaut. 2000). Białko to jest zlokalizowane w ECM słupka, nie występuje natomiast w ścianie komórkowej łagiewek. Jak wykazały liczne badania, przyleganie łagiewek pyłkowych do ECM tkanek słupka jest warunkiem niezbędnym do kierowania wzrostem łagiewki pyłkowej aż do zapłodnienia (LORD 2000). Istnieją doniesienia, że również silnie estryfikowane cząsteczki pektyn oraz ich obojętne łańcuchy boczne bywają zaangażowane w adhezję komórek, mogą więc służyć jako cząsteczki adhezyjne także rosnącym łagiewkom.

Jony wapnia

Udział jonów wapnia w kiełkowaniu pyłku i wzroście łagiewki pyłkowej jest intensywnie badany od wielu lat. Wyniki badań pokazujące decydujący wpływ jonów wapnia na wzrost łagiewek pyłkowych *in vitro* przyczyniły się do szczególnego zainteresowania embriologów roślin występowaniem wapnia w różnych tkankach słupka. Szczególnie intensywnie poszukiwano dowodów na istnienie gradientu stężenia wapnia wzdłuż drogi wzrostu łagiewki pyłkowej, który byłby czynnikiem chemoaktywnym dla rosnących łagiewek. Bardzo wysokie stężenie wolnych jonów wapnia wykryto, przy użyciu różnych metod, w synergidach zalążków bawełny (JENSEN 1965), pszenicy (CHAUBAL i REGER 1990), słonecznika (HE i YANG 1992), tytoniu (TIRLAPUR i in. 1993), rospłenicy (*Pennisetum glaucum*) (CHAUBAL i REGER 1993) i rzepaku (YU i współaut. 1998). W woreczkach zalążkowych ołownika (*Plumbago zeylanica*), które są pozbawione syner-

gid, wapń gromadzony jest obficie w komórce jajowej (TIAN i współaut. 2000). Najnowsze badania pokazują, że wapń, aby być chemoatraktantem dla rosnącej łagiewki, nie musi być rozmieszczony w formie ciągłego gradientu w słupku roślin kwiatowych. Do wywołania zmiany kierunku wzrostu łagiewki wystarczy miejscowe zwiększenie jego stężenia, np. poprzez lokalną degradację pektyn deestryfikowanych (MALHÓ i współaut. 2000).

Niezwyczajnie ważną funkcją pektyn deestryfikowanych, występujących w macierzy zewnątrzkomórkowej mikropylarnej części płodnych zalążków, jest wiązanie i magazynowanie jonów wapnia. Wolne grupy karboksylowe, powstające na skutek deestryfikacji cząsteczek pektynowych, są miejscami wiążącymi kationy, a przede wszystkim jony wapnia (CARPITA i GIBEAUT 1993). Enzymatyczna degradacja lub modyfikacja pektyn deestryfikowanych uwalnia wapń w postaci wolnych jonów, w stężeniu optymalnym dla wzrostu łagiewki pyłkowej. Pektyny deestryfikowane obecne w ECM słupka oraz w ścianie komórkowej łagiewki stanowią bufor stężenia wolnych jonów wapnia. Bardzo ważne jest, aby wolne jony wapnia obecne na drodze wzrostu łagiewki pyłkowej były w optymalnym stężeniu, ponieważ zarówno zbyt wysoka, jak i zbyt niska ich koncentracja może hamować wzrost łagiewki (BREWBAKER i KWACK 1963, PICTON i STEER 1983). Niektórzy autorzy sugerują na przykład, że wysokie stężenie jonów wapnia w synergidach hamuje wzrost łagiewki pyłkowej i powoduje jej pęknięcie i uwolnienie komórek plemnikowych. O tym, że pektynian wapnia jest najlepszym źródłem tego pierwiastka dla łagiewek pyłkowych przekonano się prowadząc doświadczenia *in vitro*. Łagiewki *Pennisetum glaucum* wykazywały pozytywny chemotropizm w kierunku źródła jonów wapnia tylko w postaci pektynianu, nie reagowały natomiast na nieorganiczne źródła tego pierwiastka (REGER i współaut. 1992).

Białka arabinogalaktanowe (AGP)

W receptywnych zalążkach roślin z rodzin Amaryllidaceae, Brassicaceae, Liliaceae i Oenotheraceae opisano pojawianie się białek arabinogalaktanowych na biegunie mikropylarnym dojrzałego woreczka zalążkowego (CHUDZIK 2002). Pojawienie się tej grupy glikoprotein nie jest równoczesne z morfologicz-

nym wykształceniem woreczka zalążkowego. Są one wykrywane dopiero w zalążkach pochodzących z otwartych kwiatów, a u niektórych gatunków dopiero po zapyleniu znamienia słupka. Obecność AGP w tkance ośrodka i kanale mikropylarnym wykrywano dopiero w zaawansowanej fazie progamicznej, co może być następstwem ich aktywnej sekrecji z gametofitu i rozprzestrzeniania się pomiędzy komórkami somatycznymi zalążka. W tkankach somatycznych badanych zalążków lokalizacja białek arabinogalaktanowych związana była ściśle z drogą wzrostu łagiewki pyłkowej, nie obejmowała całego obszaru mikropylarnego podlegającego specyficznym zmianom w procesie dojrzewania. Wiadomo, że białka arabinogalaktanowe są zakotwiczone w błonie komórkowej za pomocą kotwicy GPI (glycosylphosphatidylinositol) i mogą być od niej okresowo odcinane i wydzielane do macierzy zewnątrzkomórkowej. AGP są białkami niskocząsteczkowymi, rozpuszczalnymi w wodzie i dlatego mogą łatwo dyfundować na duże odległości w roślinnej macierzy zewnątrzkomórkowej (SERPE i NOTHNAGEL 1999). AGP wydzielone przez komórki aparatu jajowego, dyfundują do przestrzeni międzykomórkowych ośrodka mikropylarnego i do kanału mikropylarnego, co zostało zaobserwowane u *Galanthus nivalis*, *Sinapis alba*, *Galtonia candicans* i *Oenothera hookeri* (CHUDZIK 2002).

Białka arabinogalaktanowe są grupą glikoprotein zewnątrzkomórkowych, których ekspresja w różnych tkankach jest regulowana rozwojowo. Pełnią one różnorodne funkcje, m.in. biorą także udział w interakcjach podczas procesów seksualnych (SERPE i NOTHNAGEL 1999, CHEUNG i WU 1999). Mogą odgrywać rolę cząsteczek adhezyjnych i chemotaktycznych. Komentowana jest również rola AGP jako cząsteczek sygnałnych, przekazujących informacje między komórkami podczas ich rozpoznawania się (SCHULTZ i współaut. 1998). Rola taka w procesie zapłodnienia jest bardzo prawdopodobna. AGP podlegają ekspresji w dojrzałym woreczku zalążkowym, skąd są wydzielane, głównie po stronie mikropylarnej. Jako produkt powstały pod kontrolą haploidalnego genomu sygnalizują one obecność płodnego gametofitu, a równocześnie znakują miejsce aparatu jajowego woreczka zalążkowego – celu, do którego rośnie łagiewka pyłkowa.

WPŁYW PŁODNEGO GAMETOFITU NA DOJRZEWANIE TKANEK SOMATYCZNYCH W REJONIE MIKROPYLARNYM ZALĄŻKA

Wyniki wielu obserwacji wskazują na niezwykle istotną funkcję dojrzałego woreczka zalążkowego w stymulowaniu dojrzewania tkanek somatycznych. W zalążkach żeńskosterylnej formy *Oe. mut. brevistylis* oraz w zalążkach *G. nivalis*, które w okresie kwitnienia mają opóźnione w rozwoju woreczki zalążkowe, lub całkowicie zdegenerowane komórki linii generatywnej, nie obserwuje się zwiększonej aktywności wydzielniczej w somatycznych komórkach leżących na drodze wzrostu łagiewki, ani występowania wydzieliny w kanale mikropylarnym. Anatomicznie tkanki somatyczne zalążków z zablokowanym rozwojem gametofitu są wykształcone prawidłowo, ale w ich rejonie mikropylarnym nie zachodzą specyficzne zmiany morfologiczne i histochemiczne, konieczne do uzyskania receptywności. W takich zalążkach nie stwierdzono nagromadzenia w obszarze apoplastu znacznych ilości pektyn i wolnych jonów wapnia. Badania immunocytochemiczne wykazały, że w zalążkach pozbawionych woreczka zalążkowego, nawet w końcowych etapach kwitnienia, nie występuje ekspresja białek arabinogalaktanowych rozpoznawanych przez przeciwciała monoklonalne JIM 8 i JIM 13.

Obserwacje te są szczególnie interesujące w przypadku osłonek, które były opisywane jako części zalążka wykazujące znaczny stopień niezależności rozwojowej. Zamieranie woreczka zalążkowego i degeneracja tkanki ośrodka nie są skorelowane z podobnymi procesami w osłonkach (OLESEN i BRUUN 1990, ERDELSKA 1999, ŚNIEŻKO 2000). Być może procesy degeneracyjne mają inne mechanizmy w ośrodku niż w osłonkach i stąd obserwowana autonomia tych ostatnich.

WPŁYW ZAPYLENIA NA DOJRZEWANIE ZALĄŻKÓW

Niewątpliwie zapylenie i obecność rosnących łagiewek w tkankach słupka wpływa stymulująco na rozwój i dojrzewanie zalążków. Często bez zapylenia nie mogą one osiągnąć właściwej receptywności. Skrajnym przykładem mogą być niektóre storczyki, u których dopiero po zapyleniu znamienia, w zalążni rozpoczyna się rozwój zalążków od sta-

dium najwcześniejszej inicjacji do receptywności. Interesujący jest rozwój zalążków i ich interakcje z łagiewką pyłkową u przebiśniegu. Organy generatywne tego gatunku rozwijają się jesienią wewnątrz cebulek, kosztem zgromadzonych tam materiałów zapasowych. Wic-

nym sezonie wegetacyjnym, po otwarciu kwiatu i po zgodnym zapyleniu, następuje zmiana fizjologii komórek somatycznych w części mikropylarnej zalążków oraz ekspresja białek arabinogalaktanowych w woreczku zalążkowym (Ryc. 5). Sekrecja różnych substancji z komór-

	Zalążki płodne		Zalążki sterylne
	Nie zapylone	24 godz. po zapyleniu	
Wolne jony wapnia			
Pektyny deestryfikowane JIM 5			
Pektyny estryfikowane JIM 7			
AGP JIM 8 i JIM 13			

Ryc. 5. Zmiany histochemiczne w mikropylarnej części zalążków *Galanthus nivalis*, indukowane zapyleciem.

kszość zalążków u tego gatunku jest morfologicznie prawidłowo ukształtowana jeszcze przed zimą. Pomimo iż zalążki te zawierają woreczki zalążkowe z wykształconym aparatem jajowym, nie są receptywne. Dopiero w następ-

rek somatycznych i linii generatywnej nasila się podczas trwania fazy progamicznej, dzięki czemu kanał mikropylarny wypełnia się wydzieliną o złożonym składzie (CHUDZIK i współaut. 2002).

DROGA ŁAGIEWKI PYŁKOWEJ

CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA WZROST ŁAGIEWEK W SZYJCIE SŁUPKA

Większość obserwacji fazy progamicznej prowadzono bezpośrednio po zapyleniu, kiedy ziarna pyłku kiełkowały na znamieniu, lub

kiedy łagiewki przerastały szyjkę słupka. Znacznie mniej badań dotyczy końcowego stadium fazy progamicznej, kiedy wierzchołek łagiewki pyłkowej znajduje się już w zalążni. Na znamieniu i w tkance transmisyjnej słupka zgodne

łagiewki pyłkowe rosną w sposób regularny, równoległe do siebie i w przybliżeniu prostoliniowo. Na całej długości mają podobną średnicę, gładką ścianę komórkową i równomiernie rozmieszczone korki kalozowe, odgraniczające wierzchołkową część protoplastu rosnącej łagiewki. Zaproponowano kilka hipotez, tłumaczących jakie czynniki decydują o kierunku wzrostu łagiewki pyłkowej w głąb znamienia oraz w tkance transmisyjnej słupka. Za najważniejszy uznano m.in. czynnik chemoaktywny, mimo że nie określono, jaka substancja pełni tę funkcję. Za najbardziej prawdopodobne uznano oligosacharydy, niskocząsteczkowe białka i jony wapnia (MASCARENHAS i MACHLIS 1964, REGER i współaut. 1992, WILLEMSE i VLETTER 1995). Nie mniej interesujące wydają się także inne proponowane modele, m.in. mechaniczny (HESLOP-HARRISON i HESLOP-HARRISON 1986), hydrotropiczny (LUSH i współaut. 1998) oraz haptotaktyczny (SANDERS i LORD 1992, LORD 2000, MOLLET i współaut. 2000, PARK i współaut. 2000). W ostatnich latach szczególnie intensywnie badany jest mechanizm haptotaktyczny, który zakłada, że łagiewka pyłkowa jest prowadzona przez wyspecjalizowane cząsteczki macierzy zewnątrzkomórkowej słupka, na wzór migrujących komórek zwierzęcych. Przytaczane są dowody przemawiające za każdym z wymienionych wyżej mechanizmów, nie wykluczone jest także ich współdziałanie na poszczególnych etapach wzrostu łagiewki. Żaden z proponowanych modeli nie tłumaczy jednak wystarczająco zachowania łagiewek pyłkowych w zalążni, ponieważ ich sposób wzrostu różni się tu znacznie od obserwowanego na znamieniu i w szyjce słupka.

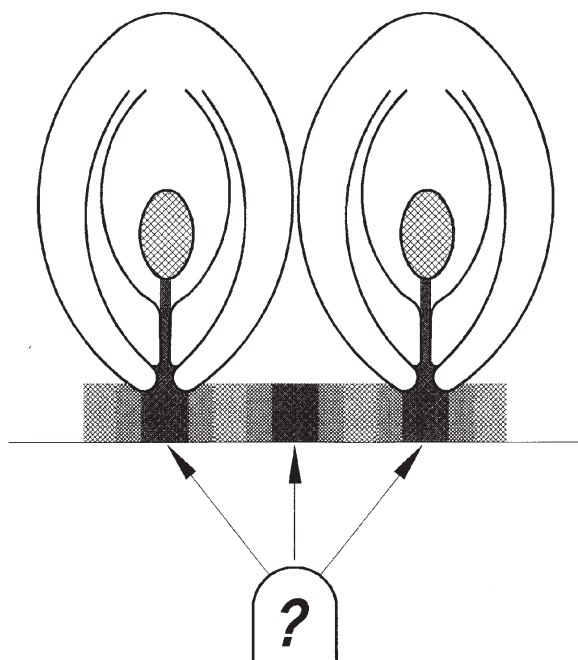
SPOSÓB WZROSTU ŁAGIEWEK W ZALĄŻNI

Na powierzchni łożyska tor wzrostu łagiewek bywa bardzo różnorodny i nieregularny. Często zmieniają one kierunek wzrostu, nawet o 180°. Niektóre łagiewki bezpośrednio odnajdują drogę do mikropyle zalążka, inne natomiast omijają wiele zalążków lub krążą w pobliżu mikropyle, ale nie wrastają do niego. Zdarza się, że łagiewki wrastają na osłonki zalążków i otaczają je lub kilkakrotnie zmieniają kierunek wzrostu na sznureczku zalążka. Kształt wielu łagiewek jest nieregularny, obserwowane są rozdęcia, a nawet krótkie boczne

odgałęzienia (HERRERO 2000, ŚNIEŻKO 2002, obserwacje własne).

Szczególny sposób wzrostu łagiewek występuje w zalążni roślin z rodzaju *Oenothera*. Na powierzchni łożyska tych roślin łagiewki tworzą liczne, długie odgałęzienia. Dzielą się na kilka podobnie wyglądających rurczek, zawierających cytoplazmę z licznymi ziarnami skrobi. Czasem rozgałęzienia są tak liczne, że tworzą struktury podobne do pędzelków. Jądro wegetatywne i komórki plemnikowe znajdują się zawsze tylko w jednym, zwykle wiodącym odgałęzieniu, jednak ostatni korek kalozowy tworzony jest przed rozgałęzieniem łagiewki (ŚNIEŻKO 1996, 1997; STRUBIŃSKA i ŚNIEŻKO 2000). Dla kontrastu, łagiewki tych roślin rosnące w szyjce słupka pokonują długi dystans nie tworząc rozgałęzień; rosną tam równoległe do siebie w postaci prostych rurczek. Natomiast w hodowli *in vitro* rozgałęziają się zaraz po wykiełkowaniu z ziarna pyłku, prawdopodobnie w odpowiedzi na brak czynników ukierunkowujących ich wzrost, jakie oddziałują na nie *in vivo* (ŚNIEŻKO 1997). Potwierdza to hipotezę, że inne czynniki kierują wzrostem łagiewek w szyjce słupka, a inne w zalążni.

Rozgałęzianie się łagiewek na powierzchni łożyska u *Oenothera* zostało zinterpretowane, jako odpowiedź na brak jednoznacznego sygnału, kierującego ich wzrostem, co nie wyklucza jednak istnienia chemoatraktantów, wysyłanych przez zalążki *Oenothera*. U tych roślin mikropyle setek zalążków dotyka do łożyska, pokrytego warstwą eksudatu. Każdy płodny zalążek wydziela na powierzchnię łożyska substancje chemotaktyczne, które dyfundują i rozpraszają się. Ponieważ poszczególne zalążki leżą bardzo blisko siebie, to w pewnych miejscach może dochodzić do nakładania się substancji wydzielanych z poszczególnych zalążków, przez co nie tworzy się jednoznaczny gradient prowadzący do źródła substancji (Ryc. 6). Łagiewka wytwarza liczne rozgałęzienia, rosnące w różnych kierunkach, aby mimo rozproszenia sygnału, dokładnie zlokalizować mikropyle. Kiedy jedno z odgałęzień odnajdzie mikropyle zalążka, staje się wiodącym i kieruje się do woreczka zalążkowego. Niektóre z odgałęzień, powstałych przed penetracją mikropyle, wrastają w szczytową część osłonki, wokół kanału mikropylarnego (ŚNIEŻKO 1996, 1997, 2002). Odgałęzienia te mogą pełnić funkcję wzmacniającą połączenie łagiewki z zalążkiem, a także rolę haustoriów odży-



Ryc. 6. Nakładanie się gradientu stężeń substancji wydzielanych z mikropyle na powierzchnię łożyska, w zalążni z licznymi zalążkami.

wiających męski gametofit, po długim okresie wzrostu, jak to opisano u fuksji (TILQUIN i współaut. 1983). Podobne zjawisko niejednoznacznego sygnału w zalążni z licznymi zalążkami opisano także u Solanaceae (LUSH i współaut. 2000).

SYGNAŁ GENEROWANY W MIKROPYLE ZALĄŻKA

Z wielokrotnymi zmianami kierunku wzrostu łagiewek na powierzchni łożyska różnych roślin kontrastuje ich precyzyjne wrastanie do mikropyle płodnego zalążka. Mikropyle jest bardzo małym otworkiem w porównaniu z powierzchnią całego zalążka, ale łagiewki odnajdują go z dużą precyzją. W warunkach *in vivo* prawie nigdy nie obserwuje się penetracji zalążków inną drogą niż przez kanał mikropylarny. Wyjątek stanowi chalazogamiczna roślina *Pistacia vera*, u której zapłodnienie zawsze odbywa się od strony chalazalnej zalążka (MARTINEZ-PALLÉ i HERRERO 1998). W tym przypadku chalazalny biegun zalążka przejął funkcje mikropyle i jest przystosowany do wspierania wzrostu łagiewki pyłkowej.

Opisany wzór wzrostu łagiewek w zalążni wielu gatunków roślin nie wyklucza działania czynników mechanicznych i haptotaktycz-

nych, ale sugeruje istnienie wyraźnych bodźców chemotaktycznych, wysyłanych prawdopodobnie przez płodny woreczek zalążkowy. Są to tzw. czynniki długodystansowe, działające jako atraktanty dla rosnących w zalążni łagiewek (HÜLSKAMP i współaut. 1995). Niezbędne są także czynniki krótko-dystansowe obecne bezpośrednio na powierzchni sznureczków i w kanale mikropylarnym zalążków, niezbędne do adhezji łagiewek pyłkowych i ukierunkowania ich wzrostu do woreczka zalążkowego. Przekonano się o tym badając żeńsko-sterylne mutanty rzodkiewnika (*Arabidopsis*), u których przyczyną niepłodności był właśnie brak adhezji łagiewek pyłkowych do powierzchni sznureczka i mikropyle zalążka (WILHELMI i PREUSS 1997).

INTERAKCJA GAMETOFITÓW I WYBIÓRCZE ZAPŁODNIENIE

Przywabianie łagiewek pyłkowych przez zalążki zawierające płodny gametofit i brak tropizmu łagiewek ku zalążkom sterilnym obserwowano także u różnych dzikich form roślin i u odmian uprawnych. U Rosaceae w zalążni znajdują się dwa zalążki, jednak tylko jeden z nich zawiera wykształcony woreczek zalążkowy, drugi natomiast nie przechodzi pełnego rozwoju – megasporogeneza nie zostaje zakończona a komórki mejotyczne ulegają degeneracji. Z części somatycznych zalążka wycofywane są materiały zapasowe. Po zapyleniu zalążek taki podlega stopniowej degeneracji, a łagiewki nigdy nie rosną w jego kierunku. Atrakcyjny dla łagiewek pyłkowych jest zawsze tylko jeden prawidłowo rozwinięty zalążek zawierający dojrzały woreczek zalążkowy (ŚNIEŻKO 2002, ARBELOA i HERRERO 1991, RODRIGO i HERRERO 1998).

Zjawisko braku interakcji męskiego gametofitu z zalążkami pozbawionymi woreczka zalążkowego obserwowano także u *Galanthus nivalis*. W ok. 50% zalążków tej rośliny woreczki zalążkowe są już morfologicznie zróżnicowane przed zimą. W pozostałych zalążkach proces mejozy jest zahamowany. Wiosną, po zapyleniu znamion, w niektórych zalążkach następuje rozwój gametofitu, lecz ostatecznie ok. 20% zalążków nie zawiera wykształconego woreczka zalążkowego. Obserwacje fazy progamicznej w setkach zapylnych kwiatów *Galanthus nivalis* wykazały, że łagiewki pyłkowe nigdy nie wrastają do zalążków pozbawionych woreczka zalążkowego. Łagiewki pyłkowe

wrastają do ok. 50% płodnych zalążków (CHUDZIK i współaut. 2002). Stosunkowo niska efektywność rozmnażania seksualnego tej rośliny może wynikać z jej zdolności do równoczesnego rozmnażania wegetatywnego. Skojarzenie obu tych procesów stwarza dobre podstawy do utrzymania licznej i zróżnicowanej genetycznie populacji w kolejnych pokoleniach.

Obserwacje prowadzone u wielu gatunków roślin wykazały, że nawet zalążki zawierające płodny gametofit nie są zapładniane w kolejności, w jakiej są ułożone na łożysku, ale wybiórczo. Łagiewki często rosną po powierzchni łożyska omijając wiele płodnych zalążków, zanim wrosną do mikropyle wybranego zalążka. Może to być proces zupełnie przypadkowy, ale niewykluczone jest też wybiórcze zapłodnienie. W literaturze istnieją doniesienia wskazujące na to, że łagiewka i woreczek zalążkowy odróżniają swoje genotypy i wybierają partnera do zapłodnienia. U *Oenothera* udowodniono selektywne zapłodnienie na podstawie analizy genotypów w pokoleniu F₁ (SCHWEMMLE 1968). Również u roślin z rodziny Cucurbitaceae i Papilionaceae stwierdzono powstawanie określonych kombinacji genetycznych w pokoleniu F₁, nie wynikających z rachunku prawdopodobieństwa, przy znanej puli pyłku niosącego określony gen (SCHLICHTING i współaut. 1987, QUASADA i współaut. 1993).

Przywabianie łagiewek pyłkowych przez woreczki zalążkowe, nie otoczone żadnymi tkankami somatycznymi, udowodniono w warunkach *in vitro* u torenii (*Torenia fournieri*) (HIGASHIYAMA i współaut. 1998). U tego gatunku woreczki zalążkowe wyrastają poza mikropylarną część zalążka i, niczym nie osłonięte, stykają się bezpośrednio z łożyskiem pokrytym bogatą wydzieliną. Tego typu zalążki, hodowane na stałym podłożu, wykazywały wyraźne działanie chemotaktyczne w stosunku do łagiewek. Natomiast zalążki poddane wcześniejszemu działaniu wysokiej temperatury nie miały takiej aktywności. Również zalążki hodowane w podłożu płynnym nie przywabiły łagiewek. Autorzy sugerują, że synergidy zalążków produkują substancję chemotaktyczną, której odpowiedni gradient formuje się jedynie na stałym podłożu. Wyniki tych badań dotyczą jednak specyficznego gatunku, u którego woreczek zalążkowy nie jest otoczony tkankami somatycznymi. U innych gatunków roślin na drodze pomiędzy łożyskiem a woreczkiem

zalążkowym znajduje się jeszcze sznureczek oraz mikropylarne tkanki osłonek zalążka, a w zalążkach gruboosrodkowych – także osrodek. Tkanki te muszą być również odpowiednio przygotowane do przyjęcia łagiewki pyłkowej.

WZROST ŁAGIEWEK PYŁKOWYCH W ZALĄŻNIACH MUTANTÓW Z UPOŚLEDZONYM ROZWOJEM ZALĄŻKÓW

Wpływ sygnałów wysyłanych przez receptywne zalążki jest wyraźny, jednak nie łatwo ocenić, czy sygnał jest generowany przez tkanki somatyczne czy przez gametofit. Sprawdzano to poprzez badania kilku grup mutantów *Arabidopsis* z upośledzonym rozwojem zalążków (HÜLSKAMP i współaut. 1995). W mutantach *bel1* i *sin1*, u których zaburzony był zarówno rozwój tkanek somatycznych zalążków, jak i woreczków zalążkowych, łagiewki pyłkowe rosły w przypadkowych kierunkach po powierzchni łożyska oraz po ścianach zalążni, nie wrastały ani na powierzchnię sznureczków, ani do mikropyle zalążków. W podobny sposób rosły łagiewki w drugiej grupie mutantów (47H4), które cechowały się prawidłowym rozwojem tkanek somatycznych zalążków, przy braku woreczków zalążkowych. Natomiast w trzeciej grupie mutantów (54D12) w tej samej zalążni obecne były prawidłowe zalążki zawierające dojrzały woreczek zalążkowy, lub zatrzymany na którymś z etapów rozwoju, i pewna liczba zalążków pozbawionych woreczków zalążkowych. W zalążniach tych mutantów łagiewki pyłkowe wrastały do 92% prawidłowych zalążków oraz do 28% zalążków z upośledzonym woreczkiem zalążkowym, nigdy natomiast nie wrastały do zalążków pozbawionych gametofitu (HÜLSKAMP i współaut. 1995). Podobne wyniki uzyskano również w przypadku semi-sterylnej linii *Arabidopsis* (TL-1), w której w połowie zalążków nie wykształcał się woreczek zalążkowy na skutek zaburzeń podczas mejozy (RAY i współaut. 1997) oraz u transgenicznych odmian tytoniu z zaburzonym rozwojem zalążków (DE MARTINIS i MARIANI 1999).

U żeńsko-sterylnej formy *Oenothera* mut. *brevistylis* większość zalążków w okresie kwitnienia nie zawiera woreczka zalążkowego lub ma zdegenerowane komórki generatywne. Po zapyleniu łagiewki pyłkowe kielkują na znamieniu słupka i rosną przez szyjkę do zalążni bez żadnych zakłóceń. Na powierzchnię łożyska wyrasta jednak mniej łagiewek niż u formy

plodnej i nie wnikają one do mikropyle zalążków. Łagiewki tworzą na końcu pętle lub kłębki, a niektóre rozgałęziają się drzewkowato, na skutek nie ukierunkowanego wzrostu (ŚNIEŻKO i WINIARCZYK 1995).

Opisane zaburzenia w rozwoju zalążków nie zmieniają wzrostu łagiewek pyłkowych na

znamieniu i w szyjce słupka. Tak więc, oddziaływanie zalążków ukierunkowujące wzrost łagiewek ma miejsce tylko w obrębie zalągni.

ZAKOŃCZENIE

Podczas fazy progamicznej, wszystkie czynniki decydujące o płodności rośliny muszą wykazywać pełne zintegrowanie struktury i funkcji. Zalążek, aby być aktywnym partnerem w tym procesie, musi być płodny, tzn. odpowiednio przygotowany do wspierania wzrostu łagiewki pyłkowej. Tkanki zalążka powinny tworzyć odpowiednie środowisko wzrostu dla łagiewki pyłkowej, dostarczać jej składników odżywczych i budulcowych oraz czynników ukierunkowujących jej wzrost do woreczka

zalążkowego. Podsumowując, aby zalążek mógł pełnić rolę aktywnego partnera w czasie rozmnażania płciowego roślin kwiatowych, musi wykazywać następujące cechy: (1) obecność dojrzałego woreczka zalążkowego; (2) prawidłowy rozwój anatomiczny i specjalizację komórek w tkankach somatycznych; (3) zdolność do oddziaływania z łagiewką pyłkową. Zalążek spełniający te warunki jest receptywny i sygnalizuje swój stan zanim nastąpi interakcja z łagiewką pyłkową.

THE OVULE AS AN ACTIVE PARTNER IN SEXUAL REPRODUCTION OF FLOWERING PLANTS

S u m m a r y

The fertility of flowering plants depends on correct course of the progamic phase (time from pollination to the pollen tube penetration into the ovule) and successful fertilization. Intercellular interactions are very important for the effective pollen tube growth in the pistil tissues. The ovule, which interacts with the male gametophyte in the final stage of progamic phase, is an active partner, attracting and supporting the pollen tube growth. To play its key role in fertilization the ovule undergoes a specific maturation pro-

cess, especially on its micropylar pole. In micropyle of the receptive ovule there are extensive intercellular spaces, filled with extracellular matrix substances important for pollen tube growth. There are present specific glycoproteins (e.g. arabinogalactan proteins – AGP), esterified pectins, and deesterified pectins, which bind calcium ions. Functions of these substances for supporting and attracting the pollen tube growth are discussed.

LITERATURA

- ARBELOA A., HERRERO M., 1991. *Development of the ovular structures in peach [Prunus persica (L.) Batsh]*. New Phytol. 118, 527–534.
- BREWBAKER J. L., KWACK B. H., 1963. *The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth*. Amer. J. Bot. 50, 859–865.
- CARPITA N. C., GIBEAUT D. M., 1993. *Structural models of primary cell wall in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth*. Plant J. 3, 1–30.
- CHAO C. Y., 1971. *A periodic acid-Schiff's substance related to the directional growth of pollen tube into embryo sac in Paspalum ovules*. Amer. J. Bot. 58, 649–654.
- CHAUBAL R., REGER B. J., 1990. *Relatively high calcium is localized in synergid cells of wheat ovaries*. Sex. Plant Reprod. 3, 98–102.
- CHAUBAL R., REGER B. J., 1993. *Prepollination degeneration in mature synergids of pearl millet: an examination using antimonate fixation to localize calcium*. Sex. Plant Reprod. 6, 225–238.
- CHEUNG A. Y., WU H.-M., 1999. *Arabinogalactan proteins in plant sexual reproduction*. Protoplasma 208, 87–98.
- CHUDZIK B., 2002. *Procesy determinujące receptywność zalążków o różnej budowie anatomicznej u roślin z rodzin: Amaryllidaceae, Brassicaceae, Liliaceae i Oenotheraceae*. Rozprawa doktorska, Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.
- CHUDZIK B., ŚNIEŻKO R., 1997. *Testing the fertility in ovules of Oenothera hookeri, Oe. mut. brevistylis – female sterile form, Capsella bursa-pastoris and Sisymbrium loeselii by induction of callose fluorescence*. Bull. Pol. Ac.: Biol. 45, 283–288.
- CHUDZIK B., ŚNIEŻKO R., 1999a. *Histochemical features signaling receptivity of ovules of Oenothera ho-*

- okeri de Vries and *Oe. mut. brevistylis*. Acta Biol. Cracov. S. Bot. 41, 119–126.
- CHUDZIK B., ŚNIEŻKO R., 1999b. *Przejawy receptywności zalążków Brassica napus L. i Sinapis alba L.* Bibl. Fragm. Agronom. 6, 57–66.
- CHUDZIK B., ŚNIEŻKO R. 2003. *Calcium ions presence as a trait of receptivity in tenuinucellar ovules of Galanthus nivalis L.* Acta Biol. Cracov. S. Bot. 45/1, 133–141.
- CHUDZIK B., ŚNIEŻKO R., SZAUB J., 2002. *Biologia kwitnienia Galanthus nivalis L. (Amaryllidaceae)*. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin-Polonia, Sectio EEE Hort. 10, 1–10.
- DE MARTINIS D., MARIANI C., 1999. *Silecing gene expression of the ethylene-forming enzyme results in a reversible inhibition of ovule development in transgenic tobacco plants.* Plant Cell 11, 1061–1072.
- ERDELSKA O., 1999. *Successive tissue degeneration in unfertilized ovules of Daphne arbuscula.* Acta Biol. Cracov. S. Bot. 41, 163–167.
- FRANSSEN-VERHEIJEN M. A. W., WILLEMSE M. T. M., 1993. *Micropylar exudate in Gasteria (Aloaceae) and its possible function in pollen tube growth.* Amer. J. Bot. 80, 253–262.
- FRY S. C., ALDINGTON S., HETHERINGTON P. R., AITKEN J., 1993. *Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall.* Plant Physiol. 103, 1–5.
- HE C. -P., YANG H. -Y., 1992. *Ultracytochemical localization of calcium in the embryo sac of sunflower.* Chin. J. Bot. 4, 99–106.
- HERRERO M., 2000. *Changes in the ovary related to pollen tube guidance.* Ann. Bot. 85 (Suppl. A), 79–85.
- HESLOP-HARRISON J., HESLOP-HARRISON Y., 1986. *Pollen-tube chemotropism: Fact or delusion? [W:] Biology of reproduction and cell motility in plants and animals.* CRESTI M. i ROMANO D. (red.). Siena, Italy, University of Siena Press, 169–174.
- HIGASHIYAMA T., KUROIWA H., KAWANO S., KUROIWA T., 1998. *Guidance in vitro of the pollen tube to the naked embryo sac of Torenia fournieri.* Plant Cell 10, 2019–2031.
- HÜLSKAMP M., SCHNEITZ K., PRUITT R. E., 1995. *Genetic evidence for a long-range activity that directs pollen tube guidance in Arabidopsis.* Plant Cell 7, 57–64.
- JENSEN W. A., 1965. *The ultrastructure and histochemistry of the synergids of cotton.* Amer. J. Bot. 52, 238–256.
- LORD E. M., 2000. *Adhesion and cell movement during pollination: cherchez la femme.* Trends Plant Sci. 5, 368–373.
- LUSH W. M., GRIESER F., WOLTERS-ARTS M., 1998. *Directional guidance of Nicotiana glauca pollen tubes in vitro and on the stigma.* Plant Physiol. 118, 733–741.
- LUSH W. M., SPURCK T., JOOSTEN R., 2000. *Pollen tube guidance by the pistil of a Solanaceous plant.* Ann. Bot. 85 (Suppl. A), 39–47.
- MALHÓ R., CAMACHO L., MOUTINO A., 2000. *Signalling pathways in pollen tube growth and reorientation.* Ann. Bot. 85 (Suppl. A), 59–68.
- MARTINEZ-PALLÉ E., HERRERO M., 1998. *Pollen tube pathway in chalazogamous Pistacia vera L.* Int. J. Plant Sci. 159, 566–574.
- MASCARENHAS J. P., MACHLIS L., 1964. *Chemotropic response of the pollen of Antirrhinum majus to calcium.* Plant Physiol. 39, 70–77.
- MOLLET J. -C., PARK S. -Y., NOTHNAGEL E. A., LORD E. M., 2000. *A lily stylar pectin is necessary for pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix.* Plant Cell 12, 1737–1749.
- OLESEN P., BRUUN L., 1990. *A structural investigation of the ovule in sugar beet, Beta vulgaris: Integuments and micropyle.* Nor. J. Bot. 9, 499–506.
- PARK S. Y., JAUH G. Y., MOLLET J. C., ECKARD K. J., NOTHNAGEL E. A., WALLING L. L., LORD E. M., 2000. *A lipid transfer-like protein is necessary for lily pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix.* Plant Cell 12, 151–163.
- PICTON J. M., STEER M. W., 1983. *Evidence for the role of Ca^{2+} ions in tip extension in pollen tubes.* Protoplasma 115, 11–17.
- QUASADA M., WINSOR J. A., STEPHENSON A. G., 1993. *Effects of pollen competition on progeny performance in a heterozygous cucurbit.* Amer. Natur. 142, 694–706.
- RAY S., PARK S. S., RAY A., 1997. *Pollen tube guidance by the female gametophyte.* Development 124, 2489–2498.
- REGER B. J., CHAUBAL R., PRESSEY R., 1992. *Chemotropic responses by pearl millet pollen tubes.* Sex. Plant Reprod. 5, 47–56.
- RODRIGO J., HERRERO M., 1998. *Influence of intraovular reserves on ovule fate in apricot (Prunus armeniaca L.).* Sex. Plant Reprod. 11, 86–93.
- SANDERS L. C., LORD E. M., 1992. *A dynamic role for the stylar matrix in pollen tube extension.* Int. Rev. Cytol. 140, 297–318.
- SCHLICHTING C. D., STEPHENSON A. G., DAVIS L. E., WINSOR J. A., 1987. *Pollen competition and offspring variance.* Evol. Trends Plants 1, 35–39.
- SCHULTZ C. J., GILSON P., OXLEY D., YOUL J., BACIC A., 1998. *GPI-anchors on arabinogalactan-proteins: Implications for signaling in plants.* Trends Plant Sci. 3, 426–431.
- SCHWEMMLE J., 1968. *Selective fertilization in Oenothera.* Adv. Genetics 14, 225–323.
- SERPE M. D., NOTHNAGEL E. A., 1999. *Arabinogalactan-proteins in the multiple domains of the plant cell surface.* Adv. Bot. Res. 30, 207–289.
- STRUBIŃSKA J., ŚNIEŻKO R., 2000. *Localization of vegetative nucleus and generative cell nuclei in branching pollen tubes of Oenothera hookeri L. growth in vitro.* Acta Biol. Cracov. S. Bot. 42/2, 107–112.
- ŚNIEŻKO R., 1996. *Pollen tube branching in the ovary of five species of Oenothera.* Acta Soc. Bot. Pol. 65, 111–116.
- ŚNIEŻKO R., 1997. *Postulated interaction between branching pollen tubes and ovules in Oenothera hookeri, de Vries (Onagraceae).* J. Plant Res. 110, 411–416.
- ŚNIEŻKO R., 2000. *Structural and functional polarization in the ovules of flowering plants.* Bot. Guidebooks 24, 87–107.

- ŚNIEŻKO R., 2002. *Final stage of progamic phase in different plant species: Rosa cv. 'Sonia', 6 taxons of Oenothera and 4 of Brassicaceae*. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin-Polonia, Sectio C, 57, 81–93.
- ŚNIEŻKO R., WINIARCZYK K., 1995. *Pollen tube growth in pistils of female-sterile and fertile plants of Oenothera mut. brevistylis*. Protoplasma 187, 31–38.
- TIAN H. Q., ZHU H., RUSSEL S. D., 2000. *Calcium changes in ovules and embryo sacs of Plumbago zeylanica L. Sex*. Plant Reprod. 13, 11–20.
- TILQUIN J. P., BROUWER K., MATHIEU A., CALIER M., 1983. *Haustorial pollen tubes in Fuchsia boliviana*. Ann. Bot. 52, 425–428.
- TILTON V. R., 1979. *The nucellar epidermis and micropyle of Ornithogalum caudatum (Liliaceae) with a review of these structures in other taxa*. Can. J. Bot. 58, 1872–1884.
- TIRLAPUR U. K., VAN WENT J. L., CRESTI M., 1993. *Visualization of membrane calcium and calmodulin in embryo sacs in situ and isolated from Petunia hybrida L. and Nicotiana tabacum L.* Ann. Bot. 71, 161–167.
- WILHELMI L. K., PREUSS D., 1997. *Blazing new trails: Pollen tube guidance in flowering plants*. Plant Physiol. 113, 307–312.
- WILLEMSE M. T. M., VLETTER A., 1995. *Appearance and interaction of pollen and pistil pathway proteins in Gasteria verrucosa (Mill.) H. Duval. Sex*. Plant Reprod. 8, 161–167.
- YU F. L., LIANG S. P., YANG H. Y., 1998. *Ultracytochemical localization of calcium in micropyle and embryo sac of Brassica napus before and after pollination*. Acta Bot. Sin. 40, 591–597.