

¹Zakład Anatomii i Cytologii Roślin UMCS Lublin, Poland

²Instytut Genetyki Roślin PAN Poznań, Poland

Krystyna Winiarczyk¹, Artur Szozda¹, Andrzej Kalinowski², Marek Radłowski²

Wybrane aspekty zapylenia żyta (Secale cereale L.)

Some aspects of rye pollination (*Secale cereale* L.)

ABSTRACT. The purpose of studies was biology of blooming, pollen grain morphology and results of 2DE analysis of pollen coat and pollen protoplast proteins of self incompatible and compatible *Secale cereale* lines. In the examined plants the structure of anther was typical of the *Poaceae* family. In the anther Ls225 and Ls193 between pollen grains the presence of a substance similar to the leftovers of tapetum cytoplasm was observed. On the stigma of the examined rye plants, relatively large amounts of pollen was situated, but one could observe a kind of diversity in the degree of stigma pollination depending on the examined line. The greatest amount of pollen deposition was found on the Amilo, Kier Ls193 and Ls225 stigmas. Summing up, the research concerning pollination in selfcompatible and selfincompatible forms of *S. cereale* shows that the plants of both forms produce a lot of viable pollen, the pollination of the stigma is abundant but it differs in the placing of pollen grains on the surface of the stigmas and there are no significant difference in ultrastructural pictures of sporoderm of pollen grains of both forms.

KEY WORDS: pollination, compatibility, stigma, pollen, rye.

Dojrzałe ziarno pyłku od momentu uwolnienia z pylnika funkcjonuje jako samodzielny organizm, którego głównym zadaniem jest dostarczenie plemników do woreczka zalążkowego. Zanim jednak do tego dojdzie, odbywają się procesy rozpoznania – przyjęcia lub odrzucenia niezgodnego pyłku. Mechanizmy te zachodzą na powierzchni znamienia, w warstwie stigmatoidalnej oraz w tkankach słupka. Jeżeli pyłek jest niezgodny, na powierzchni znamienia lub w tkankach

słupka zachodzą procesy, które zapobiegają ewentualnemu zapłodnieniu. Natomiast przy zgodnym pyłku wszystkie procesy poprzedzające zapłodnienie przebiegają prawidłowo. Na znamieniu słupka dochodzi do nagromadzenia wielu gametofitów męskich, które wzajemnie na siebie oddziałują i ze sobą rywalizują. Współzawodnictwo gametofitów zależy od naturalnych kombinacji cech, genetycznej jedności wewnątrz populacji oraz stopnia homozygotyczności [Lord 2000]. Zjawisko to wpływa na przepływ alleli do genomu przyszłego sporofitu, co odgrywa istotną rolę w ewolucyjnym rozwoju roślin wyższych [Knox 1984].

Zjawisko samoniezgodności jest definiowane przez Nettancourt [1977] jako niezdolność płodnych hermafrodytycznych roślin nasiennych do tworzenia zygot po samozapyleniu. Szacuje się, że samoniezgodność występuje u ponad połowy wszystkich roślin okrytonasiennych. Whitehouse uważał, że rozpowszechnienie zjawiska samoniezgodności pozwala wysnuć wniosek, że pojawiło się ono wcześniej w ewolucji okrytonasiennych, przed powstaniem niższych jednostek systematycznych. Natomiast według poglądów Batemana samoniezgodność pojawiła się u różnych gatunków niezależnie i w różnych okresach rozwoju ewolucyjnego [Brewbaker 1959].

Samoniezgodność jest mechanizmem kontrolowanym genetycznie, funkcjonującym w żeńskiej tkance sporofitu, obejmującym reakcje rozpoznania i odrzucenia pyłku o określonym genotypie. U większości roślin samoniezgodność jest kontrolowana przez pojedynczy, wieloalleliczny locus S, uważany przez wielu badaczy za najbardziej polimorficzny roślinny locus. Powszechnie przyjmuje się pogląd, że ekspresja tego samego allelu S w słupku i pyłku osadzonym na jego znamieniu prowadzi do rozpoznania pyłku jako niezgodnego i w konsekwencji staje się przyczyną odrzucenia [Jackson, Linskens 1990].

Wśród roślin opisywane są dwa różne mechanizmy genetycznej samoniezgodności: gametofityczna i sporofityczna. Samoniezgodność gametofityczna jest najbardziej rozpowszechniona wśród roślin okrytonasiennych i dokładnie zbadana u przedstawicieli rodzin: *Papaveraceae*, *Poaceae*, *Rosaceae*, *Solanaceae*, *Scrophulariaceae*. U większości wymienionych roślin proces ten jest kontrolowany przez pojedynczy locus, ale może być kontrolowany przez 2 loci (niektóre *Poaceae*), a nawet 3 lub 4 loci (niektóre *Ranunculaceae* i *Chenopodiaceae*). Zahamowanie wzrostu łagiewki pyłkowej zachodzi w wyniku interakcji pomiędzy produktami takich samych alleli pyłku i słupka, a system niezgodności musi być realizowany przez białkowe produkty genu S, syntetyzowane i zlokalizowane w cytoplazmie lub egzynie ziarna pyłku. W pylniku *Brassica oleracea* zidentyfikowano np. dwa współdziałające białka o masie cząsteczkowej 7,5–10 kDa, występujące w pyłku oraz w tapetum i uczestniczące w reakcji rozpoznania [Boyes, Nasrallah 1995].

W niniejszej pracy przebadano linie *Secale cereale* z genem samozgodności oraz samoniezgodne odmiany Amilo i Kier. Sprawdzono przebieg procesu zapylenia u tych form, stopień opylenia znamion oraz morfologię pyłku. Ponadto przeanalizowano zestaw białek obecnych w protoplastach oraz na powierzchni egzyny ziaren pyłku.

METODY

Materiałem do badań były rośliny otrzymane z Zakładu Hodowli Roślin DANKO (Laski): cztery linie samozgodne: Ls190, Ls193, Ls225, Ls250 oraz dwie samoniezgodne odmiany Amilo i Kier. Linie samozgodne były liniami wsobnymi pochodzącymi z przekrzyżowania odmian samoniezgodnych z linią samozgodną S 176₈₆ ze Stuttgartu.

Obserwacje dotyczące zapylenia przeprowadzono w tym samym czasie dla wszystkich linii. Na badane rośliny nałożone były izolatory, którymi co jakiś czas potrząsano. Aby ocenić stopień opylenia znamion, pobrane znamiona słupków obserwowano pod mikroskopem stereoskopowym. Morfologię ziaren pyłku u poszczególnych form prześledzono w mikroskopie elektronowym skaningowym (SEM). Materiał wcześniej utrwalono w mieszaninie 2,5% glutaraldehydu i 2,5% paraformaldehydu w buforze fosforanowym o pH 6,8. Następnie materiał odwodniono w szeregu acetonowym do suchego acetonu i wysycono CO₂ w temp. 40°C pod ciśnieniem 70 atmosfer.

Badania ultrastruktury ściany pyłku przeprowadzono w mikroskopie elektronowym transmisyjnym (TEM) Tesla BS 500 po standardowym zatopieniu w żywicy epoksydowej LR White. Metodą dwukierunkowej elektroforezy (2-DE) rozdzielono białka protoplastów ziaren pyłku dwóch samoniezgodnych odmian Amilo i Kier oraz dwóch samozgodnych linii (Ls190 i Ls225). Próbkę 10 mg pyłku homogenizowano w moździerzu agatowym z 400 µl buforu ekstrakcyjnego, a surowy ekstrakt wytrząsano z fenolem rozpuszczonym w wodzie. Białka z fazy fenolowej wytrącano 0,1 mol octanem amonu w metanolu przez 24 godz. w temperaturze -18°C. Po odwirowaniu osad suszono pod próżnią i rozpuszczano w 50 µl wodnego roztworu, zawierającego mocznik amfolit i detergent. Procedurę ekstrakcji oraz skład używanych roztworów podano w pracy Hurkmana i Tanaki [1986].

Dwukierunkową elektroforezę prowadzono według procedury podanej przez Hochstrassera i in. [1988]. W pierwszym kierunku (elektroogniskowanie białka w punkcie izoelektrycznym – IEF) białka rozdzielano w żelach poliakryloamidowych z Servalytem pH 3–10, polimeryzowanych w kapilarach o przekroju 0,8 i długości 150 mm. Spolimeryzowany żel miał długość 140 mm, a pozbawiona

żelu część kapilary stanowiła komorę na naniesienie ekstraktu białka. Po naniesieniu na końcu katodowym 12 μ l ekstraktu białka rozdzielano przez 18 godz. przy wzrastającym napięciu od 50 do 1000 V, używając zasilacza stabilizowanego EPS 3500 Amersham Pharmacia Biotech.

W drugim kierunku białka rozdzielano w 13% płytach poliakryloamidowych (0,9 \times 150 \times 150 mm) polimeryzowanych bez SDS. SDS obecny był tylko w buforze niwelującym gradient pH w kolumnkach żelu i w buforze elektrodowym. Kolumnki przed rozdzielaniem w drugim kierunku zanurzano na 2 min. w buforze niwelującym pH. Po swobodnym ułożeniu kolumnek żelowych na pionowo usytuowanych płytach poliakryloamidowych białka rozdzielano przy stałym natężeniu prądu (15 mA/150 mm²). Po około 4 godz. rozdzielania w temp. pokojowej białka w żelach poliakryloamidowych wybarwiano azotanem srebra według procedury podanej przez Heukeshovena i Dernicka [1985].

Żele z wybarwionymi białkami skanowano (SHARP JX-330) przy użyciu programu LabScan. Obrazy po 2-DE opracowano w programie Image Master 2-D Elite (wersja 3,1) firmy Amersham Pharmacia Biotech.

Punkty izoelektryczne i masy cząsteczkowe rozdzielonych peptydów określano przez ich porównanie z rozdzielonymi markerami Amersham Pharmacia Biotech „Calibration Kit” (17-0582-01) i Sigma „Silver stain SDS Molecular Weight Mixture” (M-5630).

WYNIKI

Żyto jest rośliną wiatropylną i produkuje olbrzymie ilości lekkiego pyłku. Uwolnione z pylników ziarna pyłku za pośrednictwem wiatru zostają przeniesione na znamiona słupków. Słupek u żyta był pozbawiony szyjki, a rozczłonowane znamię łączyło się bezpośrednio z załącznią. Proksymalna część obu rozgałęzień była pokryta drobnymi włoskami skierowanymi ku górze. Część dystalną stanowiły rozbudowane, piórkowate, wielokomórkowe papille. Znamię *S. cereale* było typu suchego, rozgałęzione na dwa płaty, miało piórkowatą budowę, która sprzyjała zatrzymywaniu się dużej liczby ziaren pyłku. Powierzchnię receptywną stanowiło całe znamię (ryc. 1).

Budowa pylników u badanych roślin była typowa dla rodziny *Poaceae* i nie zauważono różnic w budowie anatomicznej badanych odmian i linii. Każdy pylnik składał się z czterech mikrosporangów połączonych łącznikiem. Worek pyłkowy otoczony był ścianą zbudowaną z kilku warstw komórek: na zewnątrz epiderma, pod nią endothecium, warstwa pośrednia i tapetum. U żyta występuje tapetum sekrecyjne, które zachowuje budowę komórkową aż do momentu całkowitego ukształtowania pyłku. W czasie dojrzewania pyłku mikrospory układały się w jedną warstwę, przylegającą do ściany pylnika. Pojedyncze ziarna pyłku

były zazwyczaj odwrócone porusem do tapetum i przylegały do wewnętrznej ściany pylnika (ryc. 2). Miały one kształt owalny (elipsoidalny) z jednym porusem otoczonym kołnierzem sporodermy z widocznym operculum. Natomiast ich powierzchnia miała strukturę nierówną i gruzełkową (ryc. 3).

W prowadzonych badaniach zwrócono uwagę na radialne ułożenie ziaren pyłku w pylniku. We wszystkich analizowanych liniach żyta obserwowano peryferyczne ułożenie pyłku, tzn. że ziarna pyłku tworzyły regularny cylinder, przylegający do ściany pylnika, natomiast środek loculus był pusty.

W pylnikach *S. cereale* linii Ls225 (ryc. 4) pomiędzy ziarnami pyłku stwierdzono obecność substancji, podobnych do resztek niezresorbowanego tapetum. Pomędzy poszczególnymi ziarnami pyłku linii Ls193 obserwowano podobną, chociaż znacznie cieńszą warstwę zdegradowanego tapetum. Niezresorbowane tapetum znajdowało się przy promienistych ścianach i tworzyło sklejącą warstwę. Takiej substancji nie stwierdzono w pylnikach samozgodnych linii żyta Ls190, Ls250 ani też w przypadku samoniezgodnych odmian Amilo i Kier. W dojrzałych workach pyłkowych znajdowały się wolne ziarna pyłku, a tapetum było całkowicie zresorbowane (ryc. 5).

Obserwacje stopnia opylenia znamion wszystkich badanych form przeprowadzono na kłosach okrytych izolatorami. Wielkość ziaren pyłku zależała od pozycji kwiatu w kłosie. Największe ziarna produkowały kwiaty usytuowane w środku kłosa, w okresie pełnego pylenia. Na znamionach badanych roślin żyta były stosunkowo duże ilości pyłku, ale można było obserwować pewną różnorodność w stopniu opylenia znamion w zależności od badanej linii. Najwięcej pyłku znajdowało się na znamionach samoniezgodnych odmian Amilo (ryc.6) i Kier oraz samozgodnych liniach Ls193 oraz Ls225. Natomiast u pozostałych linii samozgodnych obserwowano średnie opylenie znamion. Ponadto zaobserwowano znaczne różnice w sposobie rozmieszczenia pyłku na znamionach wśród badanych linii. Pyłek był równomiernie rozłożony na znamionach u większości badanych form, z wyjątkiem linii Ls193 oraz Ls225. W pierwszym przypadku (Ls193) najwięcej pyłku osadzało się na szczytach znamion, a bardzo mało było w środkowej części (ryc. 7). Natomiast w linii Ls225 największe nagromadzenie pyłku obserwowano w środkowej części płatów znamion.

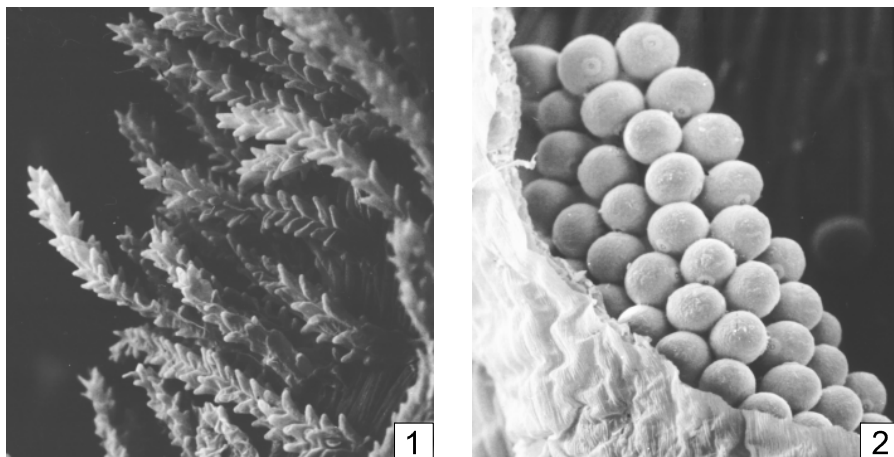
Następnie przebadano kiełkowanie ziaren pyłku w łagiewki pyłkowe *in vivo*, na powierzchni znamion. U samoniezgodnych odmian Amilo i Kier, pomimo dużego i równomiernego opylenia, tylko nieliczne ziarna pyłku kiełkowały w łagiewki pyłkowe (ryc. 8). U linii samozgodnych na powierzchni znamienia pojawiały się łagiewki pyłkowe, które kierowały się w głąb tkanek słupka (ryc. 9). Najwięcej kiełkujących ziaren pyłku obserwowano w liniach Ls193 oraz Ls225.

Aby sprawdzić, czy łagiewki pyłkowe wrastały w tkankę stigmatoidalną, wykonano preparaty macerowane, barwione błękitem aniliny i analizowano je w mikroskopie fluorescencyjnym. Na znamionach samoniezgodnych linii tylko nieliczne z osadzonych ziaren kiełkowały w łagiewki pyłkowe, w pozostałych pojawiały się korki kalozowe zarówno w krótkich, rosnących łagiewkach, jak i w porusach ziaren przylegających do komórek znamienia. Część łagiewek pozostawała na powierzchni znamienia, z dużą liczbą korków kalozowych. U samozgodnych linii łagiewki pyłkowe wrastały pod znamię i kierowały się do załączni (ryc. 10).

Sprawdzono zdolność dojrzałych ziaren pyłku pobranych z pękających pylników do kiełkowania w łagiewkę pyłkową w warunkach *in vitro*. W roztworze 2% sacharozy ziarna pyłkowe zaczynały kiełkować już po upływie 30 min. Procent kiełkujących ziaren pyłku był wysoki, około 80. Nie kiełkowały głównie małe, gorzej wykształcone ziarna. Dojrzałe ziarna pyłku *S. cereale* były początkowo odwodnione i miały nieregularną powierzchnię. Przekroje mikroskopowe pojedynczych ziaren pokazują, że występowała tam intyna o różnej grubości, podczas gdy grubość egzyny była raczej jednakowa na całym obwodzie. Wnętrze dojrzałego ziarna wypełniała gęsta cytoplazma z licznymi organellami, wśród których dominowały amyloplasty (ryc. 11). W trakcie kiełkowania pyłku w łagiewkę pyłkową plastydy przemieszczały się w cytoplazmie komórki wegetatywnej w pobliżu porusa, powodując charakterystyczną polaryzację protoplastu. Dojrzałe ziarno pyłku było trójkomórkowe, oprócz komórki wegetatywnej zawierało dwie komórki plemnikowe. Początkowo przyjmowały one kształt soczewkowaty, a następnie oszczepowaty.

Ultrastrukturalna budowa sporodermy dojrzałego ziarna pyłku pokazywała, że u *S. cereale* sporoderma składała się z cienkiej, osmofilnej egzyny i znacznie grubszej intyny. Egzyna była urzeźbiona w sposób charakterystyczny dla *Poaceae*. W egzynie pyłku żyta widoczne były radialnie ułożone kanały. Grubość egzyny u badanych linii żyta była zmienna, i tak np. u samozgodnej linii Ls193 wynosiła 272–296 nm, a u samoniezgodnej Amilo od 227 do 363 nm.

Porównywano polimorfizm białkowy samoniezgodnej linii Amilo oraz czterech samozgodnych linii wsobnych żyta. Metodą elektroforezy dwukierunkowej rozdzielono białka i peptydy protoplastów pyłku oraz oddzielnie białka ścian. Rozdział białek zachodził w zakresie pH 5,0–9,0; a większość miała masy cząsteczkowe od 66–10 kDa. W protoplastach pyłku linii Amilo występuje znacznie mniej peptydów wielkocząsteczkowych (powyżej 66 kDa) niż w linii Ls190 i Ls193. W Amilo bardzo mało jest także peptydów o niskiej masie (poniżej 16 kDa) w porównaniu z liniami Ls190 i Ls193 (ryc. 12). Porównanie składu białek powierzchniowych wykrywanych w ścianie pyłku badanych linii wykaza-

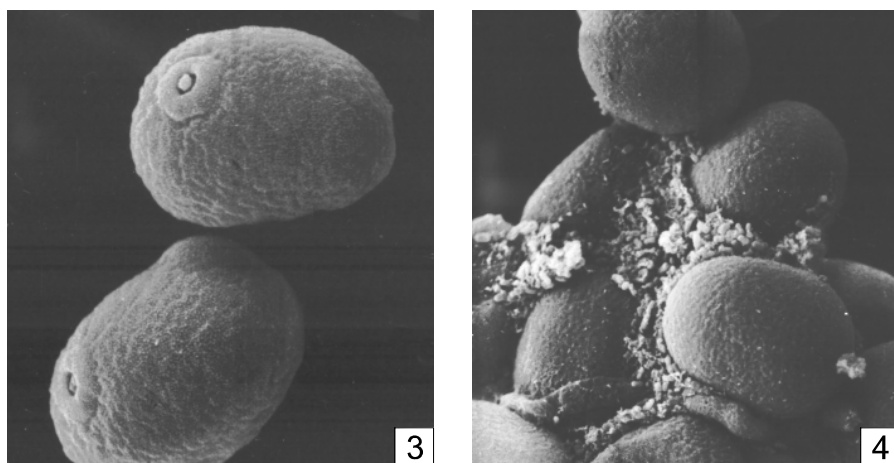


Rycina 1. Znamię *S. cereale* w początkowym okresie kwitnienia. SEM x 1000

Figure 1. Stigma of *S. cereale* taken in the initial period of blossoming. SEM x 1000

Rycina 2. Część ściany pylnika z ziarnami pyłku odwróconymi do tapetum. SEM x 1200

Figure 2. Part of anther's wall with pollen grains turned with the pori towards tapetum. SEM x 1200

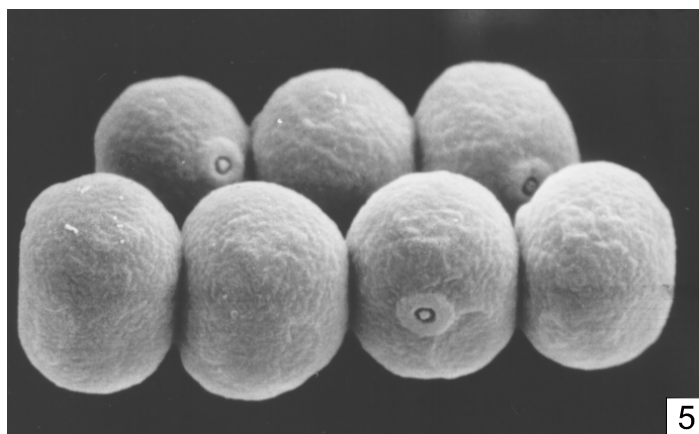


Rycina 3. Typowe dojrzałe ziarna pyłku z jednym porusem i widocznym operculum. SEM x 6000

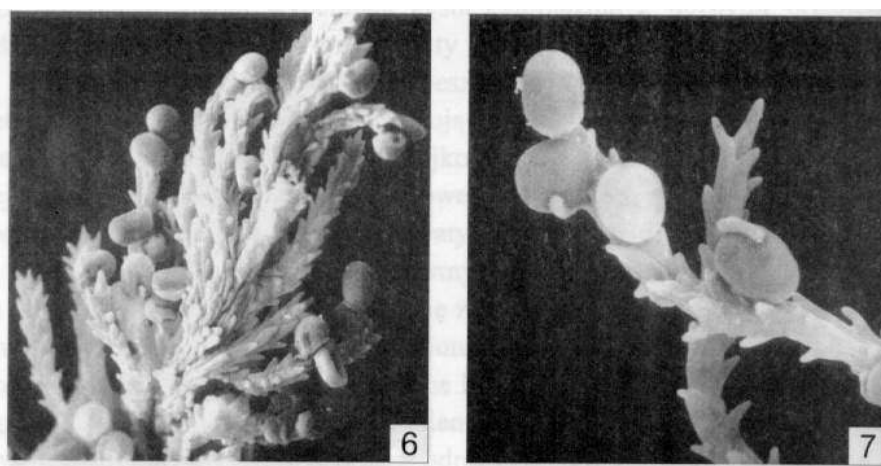
Figure 3. Typical, mature pollen grains with one porus and visible operculum .SEM x 6000

Rycina 4. Pyłek linii Ls 225 z pozostałościami tapetum. SEM x 4000

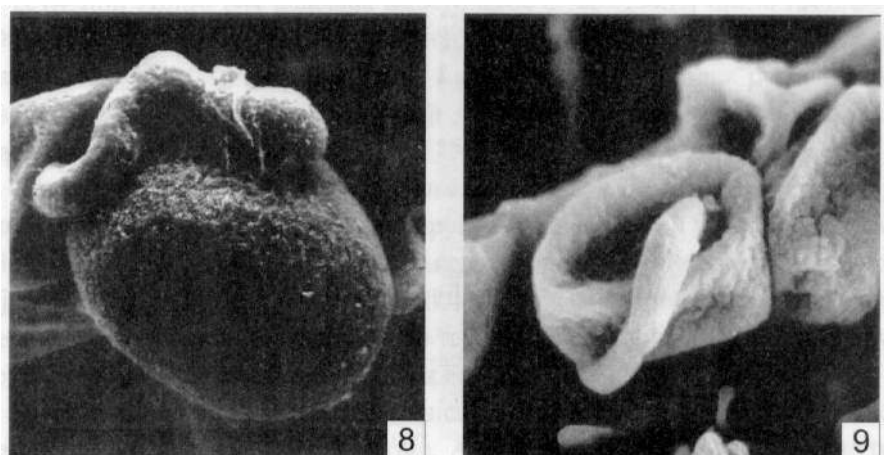
Figure 4. Pollen grains of the Ls 225 line with remains between them. SEM x 4000



Rycina 5. Pylek odmiany Amilo. SEM x 4000
Figure 5. Pollen grains of the Amilo cultivar. SEM x 4000

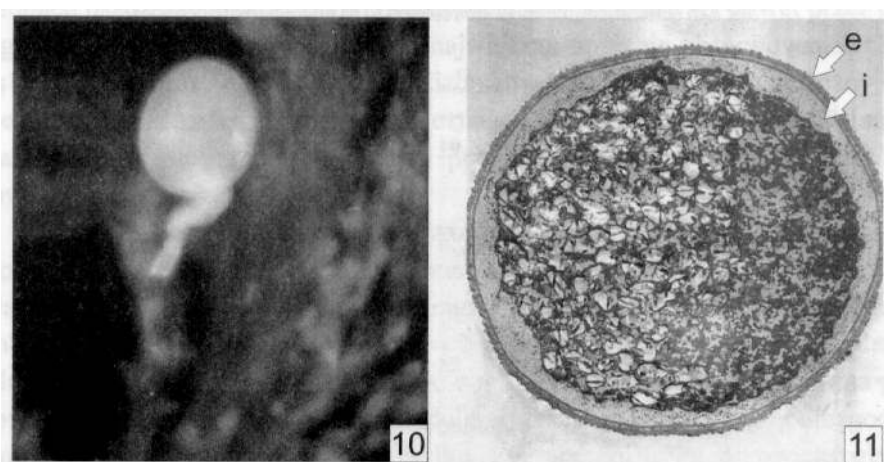


Rycina 6. Obfite opylenie znamienia odmiany Amilo. SEM x 800
Figure 6. Abundant pollination of the Amilo cultivar stigma. SEM x 800
Rycina 7. Pylek zdeponowany na szczytach znamienia w linii Ls 193. SEM x 1000
Figure 7. Pollen deposited on the tops of the stigmata of the Ls 193 line. SEM x 1000



Rycina 8. Kielkujące ziarno pyłku na znamieniu samoniezgodnej odmiany Amilo. SEM x 7000
 Figure 8. Germination of the pollen grain on the selfincompatible stigma Amilo cultivar. SEM x 7000

Rycina 9. Kielkujące ziarno pyłku na znamieniu samozgodnej linii Ls 225. SEM x 6000
 Figure 9. Germination of the pollen grain of the selfcompatible line Ls 225. SEM x 6000

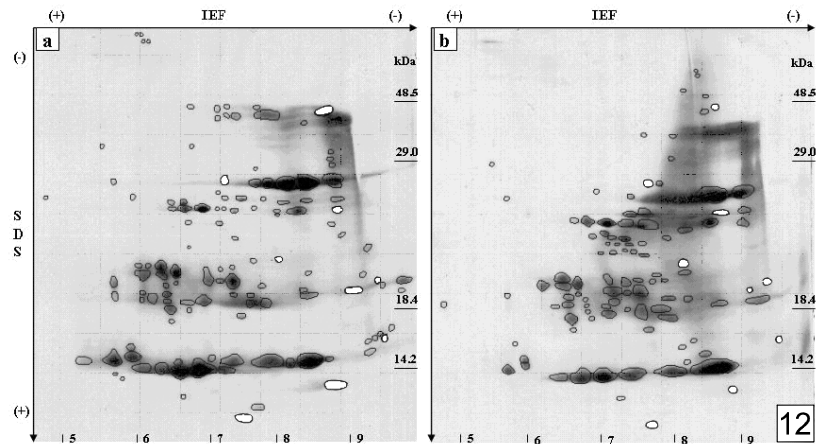


Rycina 10. Na znamieniu samozgodnej odmiany Ls 193 łagiewka pyłkowa kieruje się w głąb tkanek słupka. Mikroskop fluorescencyjny x 300

Figure 10. On the selfcompatible stigma Ls 193 line pollen tube heads towards the inside of the pistil's tissue. Fluorescence microscopy x 300

Rycina 11. Ultrastrukturalny obraz dojrzałego ziarna pyłku żyta z widocznymi amyloplastami. TEM x 6000. i-intyna, e-egzyna

Figure 11. Ultrastructural picture of the mature rye pollen grain with visible amyloplasts. TEM x 6000. i-intine, e-exine

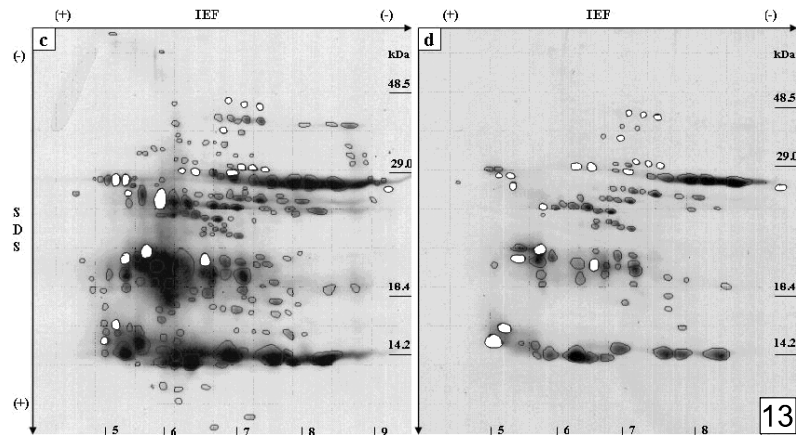


Rycina 12. Białka płaszczki pyłkowej u SI *Secale cereale* cv. Amilo (a) i cv. Kier (b). Zaznaczono 9 charakterystycznych peptydów, będących równocześnie peptydami wspólnymi dla obu tych odmian. Peptydy charakterystyczne to te, których nie wykryto w protoplastach czterech odmian żyta i we frakcjach płaszczki pyłkowej dla dwóch SC linii

Figure 12. Peptides of pollen coat of selfincompatible *S.cereale* cv. Amilo (a) and cv. Kier (b).

Nine white spots indicate peptides which a characteristic of both varieties.

Peptides which were not detected in protoplasts of four rye lines and in fractions of pollen coat for two selfcompatible lines are referred to as characteristic peptides



Rycina 13. Białka płaszczki pyłkowej u SC *Secale cereale* Ls 192 (c) i Ls 225 (d).

Zaznaczono 20 charakterystycznych peptydów, będących równocześnie peptydami wspólnymi dla obu tych linii. Peptydy charakterystyczne to te, których nie wykryto w protoplastach czterech odmian/linii żyta i we frakcjach płaszczki pyłkowej dla dwóch SI odmian

Figure 13. Peptides of *S. cereale* pollen coat of Ls193 and Ls 225 lines. Twenty characteristic peptides were marked (white spots). They were common peptides for those lines and they were not present in pollen coat fraction of two self incompatible lines

ło, że w linii Amilo jest znacznie mniej białek o niewielkiej masie (poniżej 16 kDa) niż w Ls190 i Ls193. U obu tych linii skład białek o niskiej masie jest prawie identyczny. Linia samozgodna Ls225 jest dość podobna pod względem zestawu białek do samoniezgodnej linii Amilo, ma także niewiele białek niskocząsteczkowych (ryc. 13).

Bardzo ważnym etapem generatywnego rozmnażania roślin nasiennych jest proces zapylenia, czyli zdeponowania pyłku na znamieniu. Do rodziny *Poaceae* należą typowe gatunki wiatropylnie. Anemofilia była najwcześniejszym ewolucyjnie mechanizmem przenoszenia pyłku, ale często jest wtórnym przystosowaniem do warunków środowiska, np. w rejonach, gdzie brakuje owadów zapylających, rośliny mogą przekształcić się z entomofilnych w anemofilne.

Pyłek rośliny wiatropylnej jest niesiony przez wiatr w różnych kierunkach i nie zawsze trafia na właściwe znamię. Aby zwiększyć szanse, rośliny wytworzyły wiele przystosowań umożliwiających efektywne zapylenie. Należą do nich między innymi ogromna liczba produkowanego pyłku przypadająca na jeden zalążek oraz rozbudowana powierzchnia znamion. U badanych linii *Secale cereale*, zarówno samozgodnych jak i samoniezgodnych, opylenie znamion było obfite. Sprzyjała temu budowa znamion, z silnym rozczłonowaniem i licznymi, wielokomórkowymi papillami, dającymi dużą powierzchnię chwytną. Na znamionach osadzały się setki ziaren pyłku, które tam pozostawały nawet przez dwa tygodnie. Wśród linii samozgodnych największe opylenie obserwowano u linii Ls193, Ls225 oraz Ls250. Wśród analizowanych form obserwowano różny stopień opylenia, co nie pozostaje w zależności z cechą samo- lub obcopolności. Natomiast rozmieszczenie pyłku na powierzchni receptywnej było zróżnicowane.

U linii Ls193 obfite opylenie występowało tylko na szczytach znamion, środkowa i dolna część była pozbawiona pyłku, a u linii Ls225 najwięcej pyłku osadzało się w środkowej części znamienia. Pyłek wszystkich samozgodnych linii masowo kiełkował na znamieniu w łagiewki pyłkowe. U samoniezgodnych odmian Amilo i Kier wystąpiło średnie opylenie, ale tylko nieliczne ziarna pyłkowe tworzyły łagiewki pyłkowe. W dojrzałych pręcikach linii samoniezgodnej Amilo obserwowano wolne ziarna pyłku, zaś tapetum było całkowicie zresorbowane. U dwóch spośród czterech badanych samozgodnych linii w workach pyłkowych między ziarnami pyłku leżało niewykorzystane tapetum. Obecność resztek tapetum nie utrudniała jednak wysypywania się pyłku z worków pyłkowych, gdyż w każdej linii wsobnej obserwowano się duże opylenie znamion.

Osadzenie pyłku na znamieniu jest pierwszym etapem rozpoznania między męskim gametofitem a sporofitowym znamieniem. W przypadku znamienia typu suchego ogromną rolę w tym procesie odgrywa tzw. płaszcz pyłkowy. Badania prowadzone na *Arabidopsis* udowodniły, że przyleganie pyłku do komórek

znamienia było możliwe dzięki lipofitycznym molekułom obecnym w egzynie, a nie w płaszczu pyłkowym. Lipidy odgrywały też zasadniczą rolę w początkowym etapie wzrostu łagiewki pyłkowej na znamieniu. Potwierdzają to badania na mutantach z defektem kanałów lipidowych, których ziarna nie były zdolne do kiełkowania. Po dodaniu trójglicerydów następowała hydratacja ziaren pyłkowych na znamieniu i możliwe było kiełkowanie takiego pyłku w łagiewkę pyłkową [Lord 2000].

Po osadzeniu ziarna pyłku na znamieniu następowała jego hydratacja. Proces ten może być ułatwiony przez kanały wodne w membranach plazmatycznych komórek znamienia. Prace Ikeda [1997] potwierdzają, że reakcja odrzucenia samoniezgodnego pyłku polega na braku możliwości hydratacji pyłku padającego na suche znamię u roślin z rodziny *Brassicaceae*. Odpowiedzią na rozpoznanie pyłku jako niezgodnego jest zahamowanie wzrostu łagiewki pyłkowej. Zatrzymanie wzrostu łagiewki może odbywać się: na znamieniu np. *Secale cereale*, *Papaver rhoeas*, *Brassica chinensis*, w szyjce słupka np. *Petunia violacea*, *Abutilon hybridum* lub w załączku np. *Gasteria verrucosa*, *Reseda odorata*.

Rozpoznanie i odrzucenie niezgodnego ziarna pyłku u żyta odbywa się już na powierzchni znamienia. Niezgodne gametofity męskie najczęściej nie kiełkują wcale lub też krótkie łagiewki pyłkowe nie wrastają w tkanki pod znamieniem. Cytologicznym obrazem zahamowania niezgodnych ziaren pyłku jest tzw. odpowiedź kalozowa. U *Sinapis alba* w aperturze pyłku lub na wierzchołku kiełkującej łagiewki pyłkowej oraz w ścianie papilli, do której przylega ziarno pyłku, jest syntetyzowana kalozyna [Śnieżko, Winiarczyk 1996].

Kiełkowanie pyłku jest uzależnione od typu pyłku – ziarna trójjądrowe kiełkują szybciej niż dwujądrowe. W ziarnach pyłku są zgromadzone potrzebne zapasy RNA i białek, niezbędnych do kiełkowania ziarna pyłku i początkowego wzrostu łagiewki pyłkowej. Natomiast w pyłku dwujądrowym nie ma takich zapasów, wobec tego muszą być one syntetyzowane podczas kiełkowania łagiewki pyłkowej [Krzywicka, Kowalczyk 1998]. Zdolność kiełkowania pyłku zależy ponadto od czasu zakwitania i pozycji kwiatu, z którego pochodzi pyłek. U roślin takich jak *Zea mays* czy *Oryza sativa* najwięcej żywotnego pyłku rozwija się w kwiatach, które otwierają się najwcześniej, podczas gdy kolejne kwiaty z tego kwiatostanu wytwarzają coraz mniej żywotnego pyłku. Na ogół dojrzały pyłek tylko przez krótki czas zachowuje zdolność do kiełkowania. Zależnie od gatunku pyłek traci żywotność w okresie od kilku godzin do kilku dni np. u *Zea mays*, *Triticale*, *Secale cereale* pyłek zachowuje zdolność kiełkowania przez 5–7 dni [Palfi i in. 1988].

U wszystkich badanych roślin żyta dojrzałe ziarno pyłku posiadało dwie komórki: generatywną i wegetatywną, w której dochodziło do nagromadzenia du-

żej ilości materiałów zapasowych. W wyniku mitozy z komórki generatywnej powstają dwie komórki plemnikowe. Dojrzałe odwodnione ziarno pyłku żyta ma nieregularną powierzchnię. Budowa morfologiczna sporodermy jest taka sama u wszystkich badanych linii żyta, a urzeźbienie egzyny jest charakterystyczne dla innych przedstawicieli tej rodziny, co potwierdza dotychczasowe stwierdzenia, że jest to najbardziej trwała cecha taksonomiczna [Vithanage, Knox 1979]. Ultrastrukturalna budowa sporodermy dojrzałego ziarna pyłku pokazuje, że u żyta intyna jest znacznie grubsza niż egzyna. Intyna jest zbudowana z celulozowych fibryli osadzonych w matrix zawierającej hemicelulozy i białka. W sporodermie są widoczne radialne kanały, przecinające ścianę ziarna pyłku. Dzięki obecności tych kanałów ściana jest przepuszczalna nie tylko w rejonie porusów, ale na całej powierzchni. Kanały w sporodermie umożliwiają utrzymanie chemicznego kontaktu cytoplazmy pyłku z egzyną. Tą drogą mogą również przenikać białka, enzymy i glikoproteiny odpowiedzialne za wstępne rozpoznanie pyłku [Christensen, Horner 1974]. Po zapyleniu na receptywnej części znamienia z intyny pyłku uwalniają się różne substancje, np. białka pochodzenia gametofitycznego, które reagują z białkami z receptywnych regionów znamienia. Badania prowadzone w mikroskopie elektronowym transmisyjnym przez Vithanage`a i Knoxa [1979] pokazują, że białka pyłku nie wnikają do komórek papilli. Ten decydujący moment dla wyrażenia reakcji zgodności lub odrzucenia zachodzi na powierzchni znamienia w ciągu kilku pierwszych minut. Penetracja komórek znamienia zachodzi dopiero po połączeniu pyłku ze ścianą znamienia jako efekt zgodnego zapylenia. Ziarno pyłku jest „przyjmowane” głównie w tym rejonie, gdzie następuje jego hydratacja przez ścianę, w rejonie tym kutikula jest nieciągła. Wykazano również, że jest możliwe przesunięcie znakowanych białek w rejon szczytów papilli, ponieważ kutikula jest nieefektywną barierą. Ten fakt nasuwa przypuszczenie, że po wstępnym uwodnieniu pyłku i uwolnieniu białek ze ściany mogą one przejść z powrotem do komórek znamienia i osadzić się w plazmolemmie.

Bardzo ważną cechą taksonomiczną jest charakter płaszczki pyłkowej oraz sposób jego formowania na powierzchni ziarna pyłku. Niezależnie od tego, czy jest to tzw. płaszcz tryfinowy, czy okrywa typu *pollen-kit*, jego rola jest bardzo ważna w momencie przylegania do znamienia i pierwszych reakcji rozpoznania. Użycie wyizolowanej otoczki egzynowej w doświadczeniach *in vitro* potwierdza, że ta warstwa odpowiada za aktywację powierzchni znamienia i właściwości adhezyjne u wielu gatunków roślin [Dickinson i in. 2000].

Na charakterystyczne ułożenie pyłku w pylniku u traw zwraca uwagę wielu autorów: Christensen i Horner [1974], Cebat i Zadecka [1978], Scoles i Evans [1979]. Wszyscy zgodnie potwierdzają, że u *S. cereale* wszystkie porusy ziaren pyłku są zwrócone do tapetum. W późniejszej pracy z r. 1996 Kirpes i in. mody-

fikują nieco dotychczasowe poglądy i twierdzą, że niektóre ziarna pyłku nie są dokładnie ułożone porusem do tapetum. Te opisy są zgodne z naszymi obserwacjami w mikroskopie elektronowym skaningowym, które były prowadzone na *S. cereale*. Ułożenie pyłku we wszystkich badanych liniach żyta było „peryferyczne”, ale nie wszystkie ziarna pyłku miały porusy przylegające do tapetum. Jest to jedna z cech charakterystycznych dla wszystkich gatunków należących do rodziny *Poaceae*. Wyjątek stanowią tu tylko dwa gatunki: *Anomochloa marantidea* i *Pharus lappulaceus*.

W podsumowaniu badań nad zapyleniem u samozgodnych i samoniezgodnych form *S. cereale* można stwierdzić, że: rośliny obydwu form wytwarzają duże ilości żywotnego pyłku, opylenie znamion jest obfite, ale różni się rozmieszczeniem ziaren pyłku na znamionach. Pomimo znacznie większego opylecia znamion roślin samoniezgodnych tylko nieliczne ziarna tworzą łagiewki pyłkowe. Ponadto ciekawym zjawiskiem u niektórych roślin samozgodnych jest obecność resztek niewykorzystanego tapetum. U badanych form nie zauważono istotnych różnic w ultrastrukturalnej budowie sporodermy ziaren pyłku. Zestawy białek samoniezgodnych odmian Amilo i Kier są prawie identyczne, a w samoniezgodnej linii Ls225 jest niewiele białek niskocząsteczkowych.

PIŚMIENICTWO

- Boyes D.C., Nasrallah J.B. 1995. An anther-specific gene encoded by an S locus haplotype of *Brassica* produces complementary and differentially regulated transcripts. *Plant Cell* 7, 1283–1294.
- Brewbaker J.L. 1959. Incompatibility and the pollen grain. *Rec. Adv. Bot.* 2, 46.
- Cebrat J., Zadecka A. 1978. Development of anthers in three males-sterile lines of rye (*Secale cereale* L.). *Gen. Pol.* 19, 25–31.
- Christensen J.E., Horner H.T. 1974. Pollen pore development and its spatial orientation during microsporogenesis in the grass *Sorghum bicolor*. *Am. J. Bot.* 61, 606–623.
- Dickinson H.G., Elleman C.J., Doughty J. 2000. Pollen coating-chimaeric genetics and new functions. *Sex. Plant Reprod.* 5, 302–309.
- Heukeshoven J., Dernick R. 1985. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6, 103–112.
- Hochstrasser D.F., Harrington M.G., Hochstrasser A.C., Miller M.J., Merrill C.R. 1988. Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis. *Anal. Biochem.* 73, 424–435.
- Hurkman W.J., Tanaka C.K. 1986. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.* 81, 802–806.
- Ikeda A. 1997. An aquaporin – like gene required for the *Brassica* self-incompatibility response. *Science* 27, 1563–1566.
- Jackson J.F., Linskens H.F. 1990. Bioassay for incompatibility. *Sex. Plant Reprod.* 3, 207–212.

- Kirpes C.C., Clark L.G., Lersten N.R. 1996. Systematic significance of pollen arrangement in microsporangia of *Poaceae* and *Cyperaceae*: review and observations on representative taxa. *Am. J. Bot.* 83, 1609–1622.
- Knox R.B. 1984. Pollen-pistil interaction. In: *Cellular Interaction*. Ed. H.F. Linskens and J. Heslop-Harrison, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Tokio 102, 9–24.
- Krzywnicka E., Kowalczyk S. 1998. Molekularne mechanizmy samoniezgodności homomorficznej zapobiegającej samozapłodnieniu roślin okrytonasiennych. *Post. Biol. Kom.* 1, 75–98.
- Lord E. 2000. Adhesion and cell movement during pollination: cherchez la femme. *Trends Plant Sc.* 5, 368–372.
- Nettancourt D. 1977. *Incompatibility in Angiosperms*. Springer-Verlag-Berlin-Heidelberg-New York.
- Palfi G., Gulyas S., Rajki E.S. 1988. Correlations of the quality of the pollen grains with the temporal sequence of pollen dispersion in the different parts of the inflorescence. *Acta Univ. Szeged. Acta Biol.* 34, 27–34.
- Scoles G.J., Evans L.E. 1979. Pollen development in male-fertile and cytoplasmic male-sterile rye. *Can. J. Bot.* 57, 2782–2790.
- Śnieżko R., Winiarczyk K. 1996. Pollen tube incompatibility reaction on the stigma in self-pollination *Sinapis alba* L. *Acta Soc. Bot. Pol.* 1/2, 101–105.
- Vithanage H.I.M.V., Knox R.B. 1979. Pollen-wall proteins: quantitative cytochemistry of the origin of the intine and exine enzymes in *Brassica oleracea*. *J. Cell Sci.* 21, 423–435.