

JOANNA ROJEK¹ i ELŻBIETA KUTA²

¹Zakład Genetyki i Cytologii

Uniwersytet Gdański

Kładki 24, 80-822 Gdańsk

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

²Zakład Cytologii i Embriologii Roślin

Uniwersytet Jagielloński

Grodzka 52, 31-044 Kraków

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

BIELMO – TKANKA ODŻYWIAJĄCA ZARODEK

I. BIELMO U ROŚLIN OKRYTONASIENNYCH (ANGIOSPERMAE) JAKO WYNIK PODWÓJNEGO ZAPŁODNIENIA

WSTĘP

Bielmo (endosperma, endosperm) u rozmnażających się płciowo roślin okrytonasiennych (Angiospermae) powstaje z komórki centralnej w wyniku podwójnego zapłodnienia. Podwójne zapłodnienie zostało odkryte przez rosyjskiego badacza S. G. Nawaszina w 1898 r. u *Lilium martagon* i *Fritillaria tenella*. Nieco później, w 1899 r. swoje obserwacje podwójnego zapłodnienia niezależnie opublikował francuski cytolog L. Guignard. W 1999 r., z okazji 100-letniej rocznicy tego odkrycia, ukazało się wiele artykułów przeglądowych o charakterze historycznym, jak również donoszących o najnowszych postępach i osiągnięciach w badaniach podwójnego zapłodnienia (FRIEDMAN 1998, HU 1998, JENSEN 1998, CRESTI i LINSKENS 1999, POPIELARSKA i PRZYWARA 1999, PRZYWARA i POPIELARSKA 1999).

Obecnie proces ten jest znany i uznany za powszechnie występujący u Angiospermae.

Do woreczka zalążkowego (gametofit żeński), zawierającego w typowej formie (np. typ *Polygonum*) siedem komórek (dwie synergidy, komórkę jajową, komórkę centralną z dwoma jądrami biegunowymi oraz trzy antypody)

przekazywane są za pośrednictwem łagiewki pyłkowej dwie komórki plemnikowe (gamety męskie). Dochodzi do preferencyjnego zapłodnienia, co oznacza, że jedna komórka plemnikowa łączy się z komórką jajową, zaś druga z komórką centralną. Istnieją dane świadczące o tym, że u niektórych gatunków komórki plemnikowe, zapładniające komórkę jajową, różnią się na poziomie ultrastruktury od plemników zapładniających komórkę centralną (RUSSEL 1991, 1992). Stwierdzono również, że komórki plemnikowe i jądro komórki wegetatywnej są zespolone w męską jednostkę generatywną (ang. male germ unit) (RUSSEL 1996). Elementy tej jednostki przemieszczają się razem. Takie zespoły opisano w pyłku i łagiewkach pyłkowych gatunków z rodzajów: *Plumbago*, *Brassica*, *Spinacia*, *Petunia*, *Hordeum* (TIAN i RUSSEL 1998). W wyniku podwójnego zapłodnienia powstaje diploidalny (2n) zarodek i triploidalne bielmo (3n). Należy jednak zdawać sobie sprawę, że liczba jąder biorących udział w powstawaniu bielma może być różna w zależności od typu woreczka zalążkowego oraz liczby jąder uczestniczących w fuzji, zarówno od stro-

ny komórki centralnej, jak i komórek plemnikowych (patrz RODKIEWICZ 1973, RODKIEWICZ i współaut. 1996).

Bielmo, jako tkanka odżywiająca młody zarodek, występuje u roślin nago- i okrytozalążkowych. Pochodzenie bielma jest jednak odmienne u obu grup. U *Gymnospermae* bielmo rozwija się wprost z makrospory, stanowi więc gametofit żeński, który powstaje z komórki o zredukowanej liczbie chromosomów i jest tkanką haploidalną (bielmo pierwotne, prabielmo) (RODKIEWICZ 1984). U roślin okrytonasiennych z reguły bielmo powstaje z komórki centralnej woreczka zalążkowego w wyniku podwójnego zapłodnienia i określane jest jako bielmo wtórne.

U większości roślin okrytonasiennych bielmo rozpoczyna swój rozwój przed podziałem zygoty, a od jego prawidłowego rozwoju zależy normalny rozwój zarodka. U roślin o nasionach bielmowych (np. *Solanaceae*, *Papaveraceae*, *Poaceae*) bielmo, poza funkcją odżywiania zarodka w czasie jego rozwoju, służy jako maga-

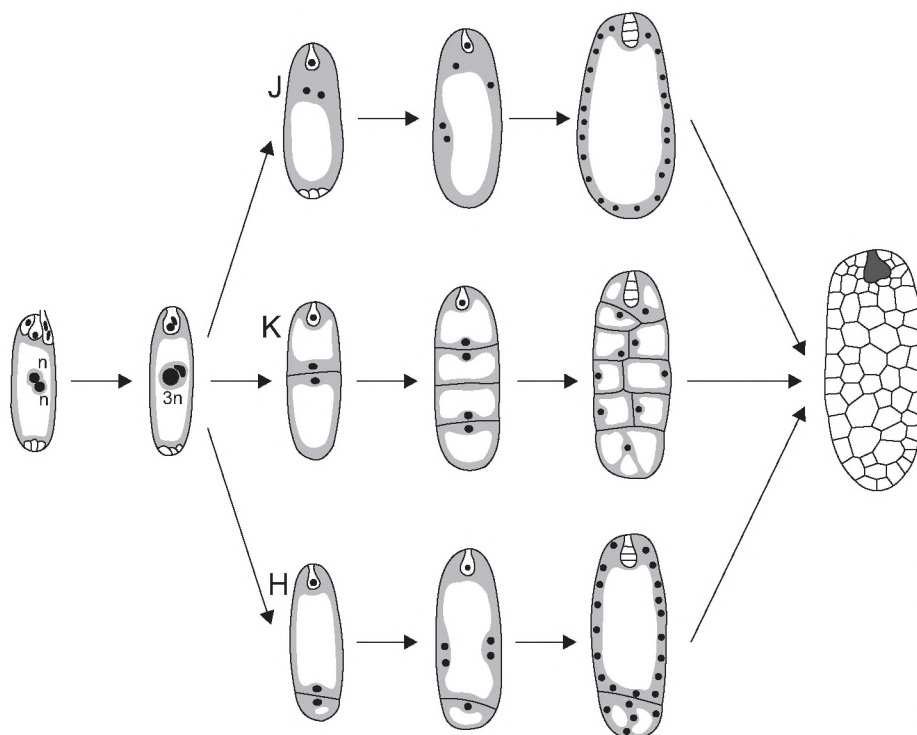
zyn substancji zapasowych w dojrzałym nasieniu. Z kolei u roślin posiadających nasiona bezbielmowe (np. *Fabaceae*, *Cucurbitaceae*, *Asteraceae*) bielmo zostaje zużyte przez zarodek w czasie rozwoju nasienia. Funkcje odżywcza i zapasową pełni wówczas najczęściej liścienie (np. fasola, rzepak). Istnieją również gatunki z nasionami, które mają substancje zapasowe zlokalizowane zarówno w bielmie, jak i w zarodku. Tylko gatunki nielicznych rodzin (*Orchidaceae*, *Podostemonaceae*, *Trapaceae*) w ogóle nie rozwijają bielma. U przedstawicieli tych rodzin wykształciły się inne twory zapewniające dopływ substancji odżywczych do zarodka. Na przykład, szczątkowe bielmo w rodzinie *Podostemonaceae* jest zastępowane przez pseudogametofit żeński, powstający ze zmodyfikowanego ośrodka, a nucellus w zalążkach (i nasionach) *Piperaceae*, *Amaranthaceae* i *Zingiberaceae* przekształca się w tkankę zwaną perispermą (obielmem) (patrz RODKIEWICZ 1973, RODKIEWICZ i współaut. 1996).

TYPY BIELMA

Wyróżnia się trzy zasadnicze typy bielma w zależności od momentu i sposobu zakładania się ścian komórkowych po podziałach jądra (jąder) w komórce centralnej: jądrowy (nuklearny), komórkowy (celularny) i helobialny

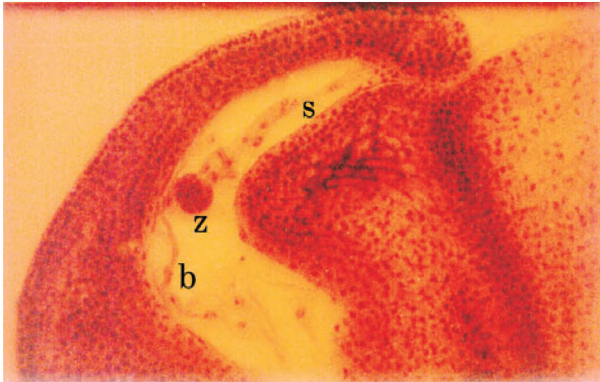
(patrz RODKIEWICZ 1973, VIJAYARAGHAVAN i PRABHAKAR 1984, LOPES i LARKINS 1993, RODKIEWICZ i współaut. 1996) (Ryc. 1).

W typie jądrowym, opisanym u gatunków z rodzin: *Fabaceae*, *Palmaceae*, *Poaceae*, *Cucur-*



Ryc. 1. Typy bielma rozwijającego się w wyniku podwójnego zapłodnienia z triploidalnej (3n) komórki centralnej. J – bielmo jądrowe; K – bielmo komórkowe; H – bielmo helobialne.

bitaceae oraz u niektórych przedstawicieli rodzin Brassicaceae i Ranunculaceae, zarówno podział pierwotnego jądra bielma, jak i szereg kolejnych podziałów jąder potomnych odbywa się bez zakładania się między nimi ścian komórkowych (Ryc. 2). Bardzo często pierwsze mitozy są synchroniczne, potem ta synchronizacja zanika, jednak jądra dzielą się w pewnym



Ryc. 2. Zarodek globularny (z) z suspensorem (s) i bielmo jądrowe (b) u *Vicia cracca* powstałe w wyniku podwójnego zapłodnienia (przeżrocze udostępnione przez Panią Annę Srokę z pracy magisterskiej).

porządku. Cykl mitotyczny może zaczynać się w jądrach leżących na biegunie mikropylarnym lub chalazalnym. Tempo podziałów może być bardzo szybkie, jak np. u *Helianthus*, gdzie cykl mitotyczny w bielmie trwa 60 minut. W cenocycie rozwijającego się bielma jądra są równomiernie rozmieszczone w cienkiej, przyściennej warstwie cytoplazmy; w centralnej części znajduje się duża wakuola, którą mogą przecinać wąskie pasma cytoplazmy. Pozycja każdego jądra jest stabilizowana przez promiennie rozmieszczone wokół niego mikrotubule. Większe zgrupowanie jąder można obserwować na biegunie mikropylarnym wokół prazarodka i na biegunie chalazalnym. U niektórych gatunków jądra na obu biegunach różnią się wielkością np. u *Brassica oleracea* (MACKIEWICZ 1973), *Brassica napus* cv. *Topas* (ROJEK 2000) i *Arabidopsis thaliana* (HERR 1999, BROWN i współaut. 1999). Liczba wolnych jąder może wahać się od kilku (*Coffea*) do kilkuset (*Primula*).

Mechanizm cytokinezy włącza się po określonej, mniej więcej stałej dla gatunku, liczbie swobodnych podziałów jąder. Badania z ostatnich kilku lat nad kukurydzą, ryżem, pszenicą i jęczmieniem, oparte o metody histochemiczne w połączeniu z mikroskopem konfokalnym

wykazały, że proces celularyzacji jądrowej endospermy jest wysoce konserwatywny (patrz BROWN i współaut. 1994, 1996a, b; OLSEN 2001; OLSEN i współaut. 1995, 1999). W bardzo rzadkich przypadkach ściany komórkowe nie tworzą się w ogóle (np. u *Tropaeolum*). Istnieją również gatunki (w rodzinach Brassicaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae), u których zewnętrzne partie bielma jądrowego ulegają celularyzacji, natomiast część bielma wokół zarodka pozostaje jądrowa (RODKIEWICZ i współaut. 1996, BECRAFT i współaut. 2001, OLSEN 2001).

W przypadku bielma typu komórkowego, występującego np. u przedstawicieli Lamiaceae, Campanulaceae, Crassulaceae, Scrophulariaceae, Gesneriaceae, Acanthaceae, Lobeliaceae, Plantaginaceae, po pierwszym podziale pierwotnego jądra bielma zakłada się ściana komórkowa dzieląca poprzecznie (rzadziej podłużnie) wewnątrz woreczka zalążkowego. Zakładanie ścian towarzyszy wszystkim dalszym podziałom jąder potomnych.

Typ helobialny jest najrzadszy i charakterystyczny dla Helobiae, Nymphaeaceae; występuje również w rodzaju *Linum*, *Trillium*, *Juncus* i innych jednoliściennych. Bielmo typu helobialnego rozwija się według pośredniego, w stosunku do wyżej opisanych, programu. Komórka macierzysta bielma dzieli się na dwie komórki nierównej wielkości; znacznie większa jest komórka mikropylarna, a chalazalna – mniejsza. Jądro w mikropylarnej komórce podlega podziałom mitotycznym bez cytokinez, co prowadzi do powstania cenocytu, podobnie jak w typie jądrowym. Po pewnym czasie, tworzą się przegrody pierwotne, błony i ściany komórkowe – powstają jednojądrowe komórki. Mała komórka chalazalna pozostaje często jednojądrowa. Opisano rozmaite warianty bielma helobialnego. Różnice między nimi są często trudne do uchwycenia i mogą np. polegać na tym, że pierwsze dwie komórki bielma są prawie równe i w obu zachodzą mitozy, a pod koniec rozwoju zaczynają się cytokinezy i tworzą się ściany komórkowe. Chalazalna komórka może u niektórych gatunków rozwijać się w haustorium. Niejednokrotnie trudno jest odróżnić typ nuklearny od wariantu typu helobialnego, ponieważ chalazalna komórka bywa bardzo mała, a ściana poprzeczna delikatna i niewyraźna.

Filogeneza poszczególnych typów rozwojowych bielma jest wciąż przedmiotem wielu sprzecznych poglądów. Jedni badacze uważają bielmo typu jądrowego za najbardziej pierwot-

ne, podczas gdy inni uznają ten typ bielma za najbardziej zaawansowany. Wnikliwą analizę przeprowadziła w 1957 r. Wunderlich (patrz RYCHLEWSKI 1968) w oparciu o korelację cech zalążków (rodzaj osrodka, liczbę integumentów i obecność komórki przykrywkowej) z typem rozwoju endospermy. Autorka za pierwotny uznała załazek gruboosrodkowy, dwuosłonkowy – z komórką przykrywkową i komórkowym typem bielma; za ewolucyjnie najmłodszy – załazek cienkoosrodkowy z jądrowym bielmem. Tak więc ewolucyjne zmiany, zdaniem autorki, prowadzą od endospermy komórkowej poprzez helobialną do jądrowej. Dane z ostatnich kilku lat, oparte o porównawczą analizę rozwojową i filogenetyczną zapłodnienia i embriogenezy u roślin okrytonasiennych i ich bliskich żyjących przodków, potwierdziły słuszność hipotezy o prymitywnym charakterze endospermy typu komórkowego (FRIEDMAN 1994); natomiast powszechnie uznaje się endospermę helobialną za najbardziej zaawansowaną ewolucyjnie.

Jakie jest ewolucyjne pochodzenie bielma? Na to pytanie szukano odpowiedzi zaraz po od-

kryciu podwójnego zapłodnienia. Do dzisiaj istnieją na ten temat dwie przeciwstawne hipotezy. Jedna z nich, zaproponowana przez Sarganta w 1900 r. postulowała pochodzenie bielma od „altruistycznego” zarodka bliźniaczego mogącego tworzyć się u przodków roślin kwiatowych. Druga, wskazywała na rozwój endospermy jako wynik opóźnionego rozwoju megagametofitu stymulowanego przez fuzję drugiej męskiej gamety z jądrem biegunowym worczka zalążkowego czyli na ewolucyjną homologię bielma z gametofitem żeńskim prymitywnych roślin nasiennych (patrz FRIEDMAN 1994). Do niedawna nie było dowodów na potwierdzenie tych hipotez. Dopiero badania z ostatnich 10 lat, dokumentujące występowanie procesu podobnego do podwójnego zapłodnienia u *Ephedria*, *Gnetum* i *Welwitschia* (rośliny nagozalążkowe), w wyniku którego powstają dwa bliźniacze zarodki z zapłodnienia komórki jajowej i komórki kanałowo brzusznej rodni, wydają się potwierdzać hipotezę, że bielmo pochodzi z nadliczbowego, zmodyfikowanego zarodka przodków roślin kwiatowych (FRIEDMAN 1990, 1992, 1994, 1995; FRIEDMAN i CARMICHEL 1996).

MODEL ROZWOJU BIELMA

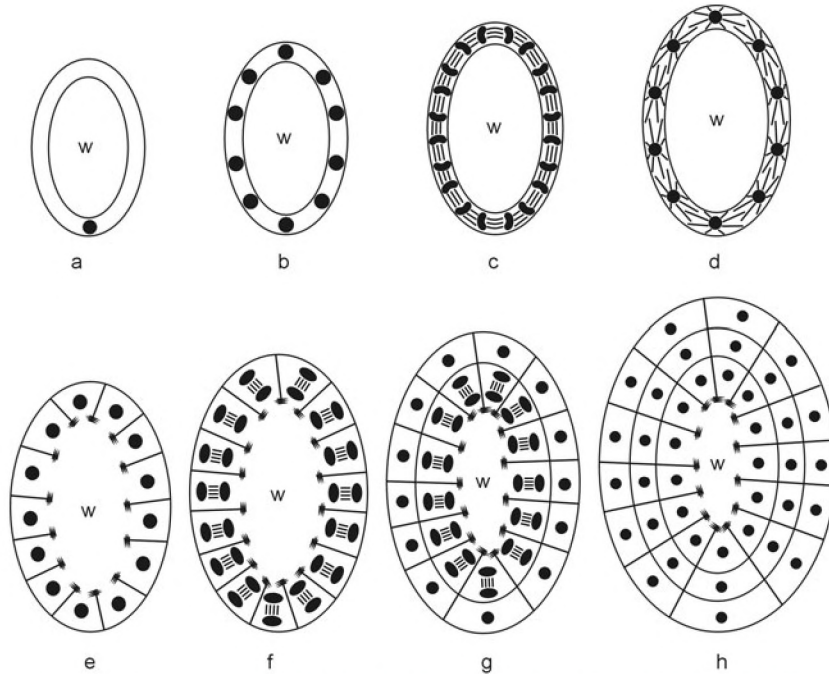
Model rozwoju bielma został opracowany na podstawie szczegółowych badań nad roślinami zbożowymi i nad *Arabidopsis* (Brassicaceae), u których występuje jądrowy typ endospermy. Wyróżniono kilka etapów rozwojowych: stadium cenotyczne, celularyzacja, różnicowanie i stadium dojrzałości. Ostatnie badania wskazują na to, że mechanizmy dwóch pierwszych faz rozwojowych endospermy są bardzo konserwatywne i obecne u większości Angiospermae (FERGER 1999, NGUYEN i współaut. 2000, BECRAFT i współaut. 2001, OLSEN 2001). Podobieństwa te dotyczą ukierunkowanej migracji jąder w stadium cenotycznym oraz odbudowy antyklinalnej ściany komórkowej. W procesie tworzenia się ściany biorą udział fragmoplasty cytoplazmatyczne tworzące się w strefie między radialnym systemem mikrotubul wychodzących z otoczki jądrowej.

Celularyzacja wielojądrowego syncytium jest skoordynowanym procesem, w którym zachodzi specyficzna sekwencja zdarzeń obejmująca cykl komórkowy, organizację cytosz-

kieletu i odtwarzanie ściany komórkowej (VAN LAMMEREN 1998, BECRAFT i współaut. 2001, OLSEN 2001). Pierwszym etapem w procesie celularyzacji jest organizacja syncytialnej endospermy w jądrowe domeny cytoplazmatyczne (ang. nuclear cytoplasmic domains, NCDs) poprzez radialne systemy mikrotubul (ang. radial microtubul systems, RMS). Funkcją RMS jest umiejscowienie równo w przestrzeni jąder endospermy i określenie miejsca zakładania się ściany. W następnym etapie dochodzi do inicjacji ścian antyklinalnych, które oddzielają sąsiadujące NCDs. Fragmoplasty kontynuują jednokierunkowy (centrypetalny) wzrost ścian antyklinalnych w kierunku wnętrza komórki centralnej. NCDs są częściowo odseparowane od siebie przez ściany antyklinalne, co w efekcie prowadzi do powstania cylindrów radialnie wydłużających się, nazywanych często alweolami. Po krótkiej przerwie, w alweolach endospermy zbóż wznawiane są mitozy i po raz pierwszy w procesie rozwoju bielma zachodzi cytokineza. Podziały peryklinalne w alweolach oddzielają zewnętrzny pokład komór-

rek i przesuwają alweole w głąb endospermy. Kolejne pokłady są wytwarzane w kierunku centrypetalnym aż osiągną region centralny; wówczas cała endosperma jądrowa jest całkowicie wypełniona komórkami. Powtarzający się schemat alweolacji i centrypetalnego wzrostu ścian komórkowych tworzy regularne pięścienie komórek endospermy (Ryc. 3, 4).

odżywianiu zarodka (NGUYEN i współaut. 2000). W dalszym rozwoju zarodka, w stadium torpedy, centralna część endospermy jest stopniowo trawiona przez rozrastający się zarodek, pozostaje tylko peryferyczny pokład komórek, porównywalny pod względem położenia i ontogenezy do warstwy aleuronowej u zbóż; jego funkcja w bezbielmowych nasionach roślin



Ryc. 3. Schematyczne przedstawienie kolejnych etapów zakładania się ścian komórkowych w bielmie jądrowym.

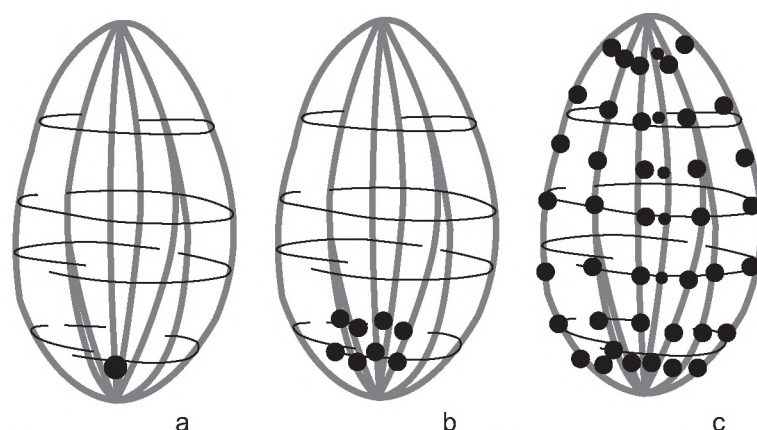
Triploidalne ($3n$), pierwotne jądro bielma zlokalizowane w proksymalnym końcu komórki centralnej (a). Wielojądrowe cenocytowe bielmo – peryferycznie zlokalizowane jądra otaczają centralną wakuolę (W) komórki centralnej (b). Cykl mitoz – widoczne wrzeciona cytokinetyczne między siostrzanymi i niesiostrzanymi jądrami (c). Radialny system mikrotubul (RMS) tworzący się na powierzchni jąderek bielma (d). Tworzenie się ścian komórkowych prostopadłych do powierzchni bielma – powstałe komórki noszą nazwę alweoli (e). Tworzenie się kolejnych warstw komórek bielma (f-h).

U *Arabidopsis*, wczesne etapy rozwoju endospermy są takie same jak u zbóż, ale uzależnione od jej położenia w zalążku (region mikropylarny, centralny, chalazalny) (BROWN i współaut. 1999, NGUYEN i współaut. 2000) (Ryc. 5). Rozwój rozpoczyna się w rejonie mikropylarnym w pobliżu zarodka, następnie jest kontynuowany w regionie centralnym i przechodzi do chalazalnego. Celularyzacja bielma rozpoczyna się w regionie mikropylarnym, a kończy się przy wejściu w obręb regionu chalazalnego, gdzie syncytialna endosperma tworzy tzw. cystę endospermalną (ang. coenocytic cyst). Położenie wielojądrowej cysty nad tkanką waskularną i obecność ścian transferowych sugeruje, że może pełnić ona funkcję haustorialnej struktury, która odgrywa rolę w

dwuliściennych jest nieznana (BROWN i współaut. 1999).

Wczesne stadia rozwoju endospermy jądrowej u traw i kapustowatych posiadają wiele podobieństw do rozwoju żeńskiego gametofitu *Gymnospermae*. W obu przypadkach przejście od inicjalnej, wielojądrowej cytoplazmy do stadium komórkowego przebiega przez tworzenie się alweoli. Proces alweolacji obserwowano u paproci nasiennych pochodzących z paleozoiku sprzed 300 mln (DOYLE 1996), co świadczy o jego bardzo wczesnym powstaniu w ewolucji.

Jaka jest korzyść z obecności syncytialnego stadium? Jedną z możliwych odpowiedzi jest szybkość rozwoju takich struktur. Alternatywną hipotezą, choć niekoniecznie wykluc-

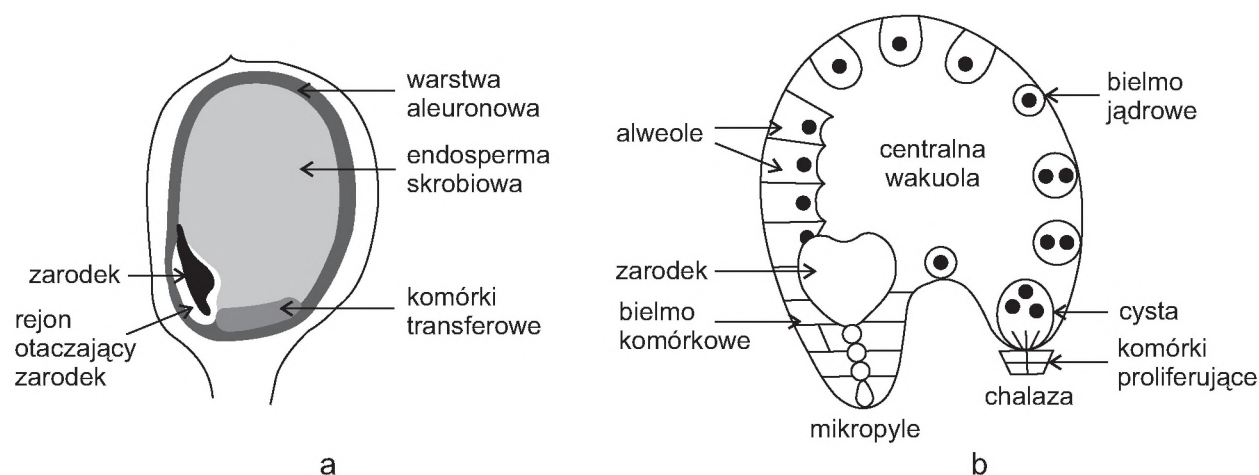


Ryc. 4. Pierwsze podziały mitotyczne w komórce centralnej prowadzące do powstania cenotycznego bielma u kukurydzy.

Pierwotne jądro bielma (a). Kilkujądrowe bielmo – jądra ułożone w peryferycznych partiach cytoplazmy komórki centralnej (b). Charakterystyczne ułożenie jąder; każde z jąder leżących u podstawy daje populację komórek, które w efekcie tworzą charakterystyczną część bielma przypominającą cząstkę pomarańczy (c) (wg OLSEN 2001, zmienione).

czającą poprzednią, jest potraktowanie syncytium jako funkcjonalnego haustorium służącego do pobierania substancji odżywczych.

kontekście interesująca jest obecność regionu podobnego do haustorium w endospermie kukurydzy powstałej w wyniku zapłodnienia *in*



Ryc. 5. Budowa bielma (a) u kukurydzy (*Zea mays*) i (b) u rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) (wg BECKRAFT i współaut. 2001 i BROWN i współaut. 1999, zmienione).

czych. Dlaczego syncytialna organizacja miałaby być korzystniejsza dla troficznej struktury nie wiadomo, faktem jest jednak, że syncytialne struktury haustorialne występują często w endospermie różnych gatunków. W tym

in vitro komórki centralnej (KRANZ i współaut. 1998), jak również regularne pojawianie się syncytialnej cysty w rozwoju endospermy u gorczyca (NGUYEN i współaut. 2000).

RÓŻNICOWANIE BIELMA

W pełni dojrzałe bielmo traw składa się z czterech typów komórek: (i) komórek otaczających zarodek (ang. embryo surrounding region, ESR), (ii) komórek transferowych zlo-

czających zarodek (ang. embryo surrounding region, ESR), (ii) komórek transferowych zlo-

kalizowanych u podstawy wiązki przewodzącej (ang. transfer cell region, TC); (iii) komórek zawierających ziarna aleuronowe (ang. aleurone layer, AL); (iv) komórek z ziarnami skrobi (ang. starch endosperm, SE) (LOPES i LARKINS 1993, OLSEN 1998, 2001; OLSEN i współaut. 1999).

Zarodek rozwija się w kieszeni utworzonej wewnątrz endospermy skrobiowej (ESR) i we wczesnych stadiach proksymalny koniec zarodka jest połączony suspensorem z endospermą. U kukurydzy, region ESR we wczesnych stadiach rozwojowych zarodka (5 dni po zapyleniu) jest ograniczony do endospermy ściśle otaczającej zarodek i dolną część wieszadła (SCHEL i współaut. 1984, OPSAHL-FERSTAD i współaut. 1997). Region ESR, zbudowany z małych komórek o gęstej cytoplazmie, może prawdopodobnie pełnić funkcję suspensora dla młodych zarodków. Komórki ESR są pozbawione wzrostów, charakterystycznych dla komórek transferowych; nie ma też połączeń plasmodesmowych między komórkami ESR a komórkami skórki zarodka (SCHEL i współaut. 1984).

Pomimo, że mechanizm różnicowania się regionu ESR jest nieznan, wzorzec aktywności mitotycznej w komórce centralnej po zapłodnieniu może dostarczyć pewnych informacji o nim. Wykryto trzy różne geny *Esr1*, *Esr2* i *Esr3*, które ulegają specyficznej ekspresji w tym regionie (OPSAHL-FERSTAD i współaut. 1997). Istnieje kilka spekulacji co do roli tych genów, a raczej ich produktów. Według jednej z nich odgrywają one rolę w odżywianiu zarodka i/lub w regulacji związanej z kontrolowaniem wzorca ekspresji; druga zakłada, że geny *Esr* mogą odgrywać rolę w ustabilizowaniu fizycznej bariery pomiędzy zarodkiem a endospermą podczas rozwoju nasienia, co przejawia się w modyfikacjach komórek endospermy przylegających do zarodka i prowadzi do powstania jamy zarodkowej (ang. embryonic cavity). Nieobecność ekspresji *Esr* w spontanicznie powstałych mutantach bez zarodków sugeruje z jednej strony zależność ekspresji *Esr* od sygnałów pochodzących od zarodka (OPSAHL-FERSTAD i współaut. 1997, OLSEN 2001), z drugiej zaś obecność u takich mutantów normalnie wykształconego regionu ESR wskazuje na to, że bielmo ma wewnętrzny program do tworzenia tej struktury.

Mechanizm powodujący determinację komórek regionu ESR nie jest znany. W oparciu o obserwacje tworzenia się ścian komórkowych

w cenocytowej endospermie w okolicy zarodka u kukurydzy wydaje się, że ESR powstaje dzięki mechanizmowi odpowiedzialnemu za tworzenie się fragmoplastów w okolicy zarodka. Wykrycie regionu promotorowego dla trzech genów *Esr*, kierującego ekspresją genu reporterowego GUS w komórkach ESR transgenicznym linii kukurydzy, powinno rzucić światło na molekularne mechanizmy różnicowania się tego regionu (BONELLO i współaut. 2000, OLSEN 2001).

Komórki transferowe bielma tworzą się w rejonie tkanki waskularnej. U wszystkich zbóż komórki te charakteryzuje obecność znacznych wzrostów transferowych ściany komórkowej oraz silnie rozbudowany wewnętrzny system błon.

Badania nad kukurydzą wykazały, że miejscowy sygnał dla różnicowania komórek transferowych pojawia się już we wczesnym stadium rozwoju bielma. Poparciem dla takiej hipotezy jest obecność transkryptu *END1* w jądrach endospermy u jęczmienia (DOAN i współaut. 1996) i czterech genów *Bet* u kukurydzy. Pomimo, że do tej pory nie udało się określić funkcji tych dwóch grup genów wiadomo, że występowanie transkryptów jest ograniczone do komórek transferowych komórkowej endospermy (DOAN i współaut. 1996, OLSEN 2001). *BETL-1*, pierwszy molekularny marker znaleziony dla komórek transferowych u kukurydzy, koduje 7-kD polipeptyd ściany komórkowej odgrywający prawdopodobnie znaczącą rolę w strukturalnej specjalizacji komórek transferowych. Ostatnio wykryto trzy kolejne geny: *BETL 2-4* (HUEROS i współaut. 1999b), których ekspresja zachodzi w różnym czasie po zapyleniu.

W peryferycznej części endospermy różnicuje się warstwa aleuronowa, która może składać się z jednego (np. u kukurydzy i pszenicy), lub kilku pokładów komórek (np. u ryżu i jęczmienia). Komórki tej warstwy charakteryzuje obecność gęstej cytoplazmy zawierającej ziarna aleuronowe oraz silnie rozwinięty system retikulum endoplazmatycznego i liczne mitochondria. Badania nad różnymi przedstawicielami traw wskazują na zależność pomiędzy grubością warstwy aleuronowej a czasem jej różnicowania. Wydaje się, że u gatunków z wielowarstwowym pokładem, proces różnicowania zaczyna się wcześniej niż u gatunków posiadających tylko jedną warstwę, co sugeruje, że proces różnicowania może być przez jakiś czas hamowany (BECRAFT i współaut. 2001). Badania genetyczne wykazały, że roz-

wój warstwy aleuronowej może być podzielony na dwa etapy: specjalizację i różnicowanie komórek. Najwcześniej pojawiającym się markerem molekularnym w różnicujących się komórkach tej warstwy jest wykryty u jęczmienia transkrypt *Ltp2*. Do innych genów markerowych warstwy aleuronowej należą geny: *Ltp1*, *B22E*, *pZE40*, *ole-1* i *ole-2* oraz *per-1*. Ostatnio wykryto dwa geny, kierujące losem komórek, których mutacje *cr4* i *dek1* powodują obecność komórek endospermy skrobiowej w części peryferycznej (BECRAFT i współaut. 2001). Dalsze badania nad mechanizmami kierującymi specyficzną-komórkową regulacją tych genów dostarczą informacji o różnicowaniu się komórek tej warstwy.

Endosperma skrobiowa stanowi największą masę komórek w bielmie (np. 80000–

90000 komórek u jęczmienia). Komórki tej warstwy zawierają skrobię syntetyzowaną w amyloplastach przy udziale 4 enzymów: AGPase (ang. ADP-glucose pyrophosphorylase), SS (ang. starch synthases), BE (ang. branching enzymes) i DE (ang. debranching enzymes), spośród których gen *SSI* pszenicy i główna izoforma AGPase jęczmienia są najwcześniej pojawiającymi się markerami molekularnymi w komórkach endospermy skrobiowej. Drugą specyficzną komponentą komórkową tej warstwy są białka zapasowe (prolaminy) (OLSEN 2001). Ciągłe mało jest informacji dotyczących wczesnych etapów różnicowania się komórek endospermy skrobiowej, w przeciwieństwie do bogatej literatury opisującej molekularne podłoże metabolizmu białek zapasowych i skrobi.

OBUMIERANIE BIELMA

Endosperma zwykle osiąga kres swojego istnienia w momencie dojrzewania nasienia, kiedy zmagazynowane w jej komórkach materiały zapasowe ulegną mobilizacji. W nasionach bezbielmowych degradacja komórek zaczyna się w czasie rozwoju zarodka. W nasionach bielmowych, do których należą ziarniaki zbóż, degradacja endospermy skrobiowej rozpoczyna się w czasie kiełkowania nasion; nieco później następuje zamieranie komórek warstwy aleuronowej. Zmiany jakie obserwowano w trakcie degradacji bielma wielu roślin są w wielu punktach zbieżne z apoptozą u zwierząt. Uznaje się, że programowana śmierć (PCD) w komórkach bielma jest częścią programu rozwojowego, zapewniającego roślinom prawidłowy przebieg kiełkowania nasion i jest regulowana hormonalnie (patrz WOJCIECHOWSKA 2001).

Internukleosomalną degradację DNA, której wskaźnikiem jest drabinkowy wzór rozdziału elektroforetycznego DNA, opisano podczas PCD bielma u kukurydzy i pszenicy (YOUNG i GALLIE 1999). Na podstawie wyników testu kometkowego, w bielmie *Haemantus albiflos* wykryto charakterystyczne zmiany w strukturze chromatyny towarzyszące PCD (LEŚNIEWSKA i współaut. 2000).

Wiele danych wskazuje na to, że programowana śmierć komórki i zmiany aktywności nukleaz związane są z obecnością etylenu, co potwierdziły badania nad mutantem *shrunken2* kukurydzy, który produkuje dużą ilość etylenu. Mutant ten charakteryzował się przedwczesnym dojrzewaniem komórek endospermy i obumieraniem większej liczby komórek niż typ dziki (YOUNG i współaut. 1997).

STOSUNEK GENOMÓW MATCZYNEGO:OJCOWSKIEGO (2:1)

U większości rozmnażających się płciowo roślin kwiatowych prawidłowy rozwój bielma i nasienia zależy od stosunku (2:1) genomów matczynego i ojcowskiego. JOHNSON (1980) i współpracownicy zaproponowali tzw. hipotezę EBN (ang. endosperm balance number) zakładającą, że odwrócenie tego stosunku powoduje obumieranie nasion, aczkolwiek w przyrodzie znane są przypadki (np. autonomiczne apomikty, gatunki rozmnażające się

płciowo z autonomiczną endospermą, taksony u których rozwój megagametofitu przebiega wg typu *Oenothera*, *Penea*, *Peperomia*, *Fritillaria* i *Plumbagella*), gdzie mimo odmiennego od 2:1 stosunku genomów matczynego i ojcowskiego rozwój bielma przebiega normalnie. Wskazuje to na istnienie innych mechanizmów odpowiedzialnych za normalny rozwój bielma i nasion.

Niemniej jednak badania nad przedstawicielami wielu rodzajów, np. *Avena*, *Datura*, *Medicago*, *Gossypium*, *Impatiens*, *Triticum*, *Dactylis*, *Trifolium*, *Solanum*, potwierdzają słuszność hipotezy EBN (patrz EHLENFELD i ORTIZ 1995). Eksperymenty polegające na modyfikacji krzyżówek wewnątrz- i międzygatunkowych, na tych samych lub różnych stopniach ploidalności wykazały, że system powstawania bielma jest kontrolowany i regulowany przez wiele genów, niezależnie od typu krzyżowań. Sukces czy też niepowodzenie krzyżowań wewnątrz- i międzygatunkowych są zależne od tzw. „efektywnej ploidalności” (ang. effective ploidy); w bielmie musi być zachowany stosunek 2:1 genomów matczynego i ojcowskiego.

Badania nad genetyczną kontrolą EBN i mechanizmem „efektywnej ploidalności” u aneuploidów *Datura stramonium* L., uzyskanych w wyniku eksperymentalnych krzyżowań triploidów z tetraploidami (JOHNSON i HANEMAN 1999) wykazały, że do zmiany EBN komórki centralnej wystarczą dwa chromosomy reprezentowane jako dodatkowe kopie, z czego wyraźnie wynika, że niekoniecznie cały genom musi uczestniczyć w determinacji EBN w bielmie. System EBN funkcjonuje również w przypadku eliminacji chromosomów, co obserwowano zarówno w bielmie, jak i zarodku w wyniku krzyżowań *Hordeum vulgare* z *H. jubatum* (EHLENFELD i ORTIZ 1995).

U kukurydzy jakiegokolwiek odstępstwa od normalnego (2:1) stosunku genomowego powodowały zaburzenia w rozwoju endospermy i zapadanie się nasion. U *Arabidopsis* były przyczyną zaburzeń rozwojowych w endospermie. Zwiększenie udziału genomu matczynego (6:1) powodowało przedwczesną celularyzację endospermy, co ostatecznie prowadziło do obumierania całego nasienia. W odwrotnym eksperymencie, w którym zmniejszono udział genomu matczynego (2:3) celularyzacja endo-

spermy była opóźniona; jądra ulegały silnej proliferacji, co wskazuje na związek kontroli cyklu mitotycznego z celularyzacją (patrz EHLENFELD i ORTIZ 1995).

Z ewolucyjnego punktu widzenia można przyjąć, że teoretycznie wszystkie rośliny okrytonasienne, rozmnażające się na drodze płciowej, powinny posiadać system podobny do EBN, pozwalający na stabilizację potomstwa o prawidłowej (pożądaney) ploidalności. Przy założeniu silnej presji selekcyjnej dla takiego systemu można przypuszczać, że system EBN rozwinął się bardzo wcześnie w toku ewolucji roślin okrytozalążkowych (patrz EHLENFELD i ORTIZ 1995).

Znaczenie prawidłowego stosunku genomów matczynego:ojcowskiego może w pewnym stopniu wyjaśnić imprinting genomowy polegający na epigenetycznych modyfikacjach zmieniających ekspresję genów zależną od rodzicielskiego pochodzenia (HAIG i WESTOBY 1991).

Ostatnio, w badaniach nad autonomicznymi apomiktami, podjęto próby wyjaśnienia rozwoju bielma i nasion bez zapłodnienia (VINKENOOG i SCOTT 2001) czyli przy braku zachowanego stosunku 2:1 genomów rodzicielskich, co więcej – bez udziału genomu ojcowskiego. Według autorów u podstaw leży imprinting genomowy. Można założyć, że przez „usunięcie” (wymazanie) imprintingu genomowego z matczynego genomu endospermy, dochodzi do ekspresji genów matczyńskich (normalnie inaktywowanych), a to z kolei wystarcza do zastąpienia genomu ojcowskiego. Potwierdzeniem tej hipotezy jest uzyskany mutant *fie Arabidopsis* o nisko zmetylowanym genomie, u którego autonomiczny rozwój endospermy przebiega normalnie mimo braku zapłodnienia (VINKENOOG i współaut. 2000, VINKENOOG i SCOTT 2001).

CYTOLOGIA BIELMA

Stosunki kariologiczne endospermy zależą w pierwszym rzędzie od typu woreczka zalążkowego. U większości roślin endosperma jest triploidalna (3n). Pojęcie diplo- i triploidalności nie jest jednoznaczne ze stopniem ploidalności danej tkanki. Ścisłe triploidalne jądro (3n) powstaje u roślin diploidalnych, które w swoich tkankach somatycznych posiadają dwa genomy (2n=2x). U poliplo-

idów endosperma ma odpowiednio wyższy stopień ploidalności, np. u tetraploidów jest heksaploidalna (3n= 6x). Dlatego należy różnicować liczbę podstawową „x” oraz haploidalną „n” i nie powinno się ich stosować jako synonimy (RYCHLEWSKI 1968, OLSZEWSKA 1999).

Triploidalna endosperma występuje u roślin z woreczkiem zalążkowym typu Polygo-

num, *Allium*, *Drusa* i *Adoxa*. Jednak w pozostałych typach woreczków liczba ta waha się od $2n$ do $15n$. Wiąże się to z występowaniem różnej liczby jąder biegunowych lub pewnymi procesami wtórnymi zachodzącymi w toku różnicowania się woreczka zalążkowego. W typie *Oenothera* gametofit żeński wytwarza tylko jedno jądro biegunowe, które, łącząc się z komórką plemnikową, daje diploidalne jądro endospermy ($2n$). W typach woreczków *Penea* i *Plumbago* występują cztery jądra, stąd endosperma jest pentaploidalna ($5n$). Ta sama liczba występuje w woreczkach typów *Fritillaria* i *Plumbagella*, jednak taka ploidalność powstała na innej drodze. Najwyższe stopnie ploidalności osiąga endosperma w woreczkach zalążkowych typu *Peperomia*. W zależności od gatunku, po zapłodnieniu ploidalność pierwotnego jądra endospermy może wynosić od $9n$ (8 jąder biegunowych + 1 komórka plemnikowa u *Peperomia pellucida*) do $15n$ (14 jąder biegunowych + 1 komórka plemnikowa u *P. hispidula*) (patrz RYCHLEWSKI 1968, RODKIEWICZ i współaut. 1996).

W toku różnicowania się histologicznego endospermy pierwotna liczba chromosomów w wielu jądrach tej tkanki ulega różnym przemianom. To zróżnicowanie może być wynikiem wielu procesów: endoreplikacji DNA (endomitozy, endoreduplikacja) prowadzącej do zwielokrotnienia ilości DNA poza cyklem komórkowym, zaburzonych i nienormalnych mitoz, powstawania jąder restytucyjnych, fragmentacji i fuzji jąder. Procesy te prowadzą najczęściej do podwyższenia stopnia ploidalności, rzadziej do obniżenia, do aneuploidalności lub zmiany struktury chromosomów (patrz RYCHLEWSKI 1969; TURAŁA-SZYBOWSKA 1974, 1979, 1986; NAGL 1978; MARCINIAK 1991, 1993; MAŁUSZYŃSKA 1999; GABARA 2001). Już w 1940 r. Clark i Copeland obserwowali w endospermie *Zea mays* nienormalne anafazy z opóźnionymi chromosomami i mostami chromosomowymi (patrz RYCHLEWSKI 1969). Takie anomalie mogą prowadzić do rozerwania chromosomów, a po ich replikacji i nierozłączeniu się chromatyd siostrzanych mogą powstać chromosomy dicentryczne, co z kolei prowadzi do dalszych fragmentacji chromosomów. Spotykane niekiedy w endospermie figury amitotyczne są oznaką skrajnie anormalnego podziału jąder. Jądra takie przeżywają się biskoptowato i ulegają fragmenta-

cji na dwa nierównowartościowe, pod względem ilości i jakości substancji chromatynowej, jądra. Występowanie amitoz jest często oznaką degeneracji bielma (patrz RYCHLEWSKI 1969).

Zakłócenia mitoz, polegające na wytworzeniu się w anafazie mostów chromosomowych mogą również prowadzić do wytworzenia jąder restytucyjnych o podwojonej liczbie chromosomów. Takie procesy opisywano w endospermie *Iris*, *Anemone nemorosa* i innych gatunków. U *Anemone* proces tworzenia jąder restytucyjnych w autonomicznym bielmie ($2n$) może powtarzać się kilkakrotnie doprowadzając do powstania jąder 16-32-ploidalnych (TRELA 1963).

Zwielokrotnienie liczby chromosomów może odbywać się na drodze endoreplikacji DNA, która towarzyszy różnicowaniu komórek u roślin. Poziom endopoliploidalności jest z reguły wyższy w rozwijających się tkankach i w organach spichrzowych (bielmo, liścienie), o co najmniej kilka rund endoreplikacji DNA niż w korzeniach, łodygach i liściach danego gatunku. U Angiospermae najwyższa zawartość jądrowego DNA była notowana u *Phaseolus coccineus* w suspensorze ($4096n$) i endospermie ($192n$), w endospermie u *Echinocistis lobata* ($3076n$) i *Vicia faba* subsp. *minor* ($1536C$) oraz w haustorium endospermalnym *Arum maculatum* $24576n$ (patrz MARCINIAK 1991, 1993; GABARA 2001). Przy wysokim stopniu endopoliploidalności powstają chromosomy politeniczne; u roślin opisano je u kilku gatunków np. w endospermie u *Allium ursinum*, *Bryonia dioica* i *Vicia faba*, w haustoriach endospermalnych u 3 gatunków *Rhinanthus* (TURAŁA 1969, TURAŁA-SZYBOWSKA 1979, MARCINIAK 1991).

Jądra rozwijającej się endospermy podlegają przemianom kariologicznym, wynikiem których jest najczęściej podwyższenie stopnia ploidalności jąder. W konsekwencji bielmo jest tkanką o charakterze mozaikowym, w której jądra osiągają różny stopień ploidalności.

Endosperma jest tkanką troficzną, często efemeryczną, która degeneruje po osiągnięciu wysokiego stopnia ploidalności. Tkanką o zbliżonym charakterze i podobnych procesach różnicowania jąder jest tapetum pylnikowe. Wydaje się, że osiąganie wysokiego stopnia ploidalności jest normalnym mechanizmem różnicowania tych tkanek (MAŁUSZYŃSKA 1999).

MUTACJA *fie* U *ARABIDOPSIS*

Rozwój nasienia u roślin kwiatowych obejmuje zespół procesów rozwojowych inicjowanych w momencie podwójnego zapłodnienia, w wyniku którego powstaje zarodek i endosperma. Komórka jajowa i centralna w młodym woreczku zalążkowym normalnie nie wykazują żadnego rozwoju, aż do momentu zapylenia i zapłodnienia. W wielu rodzinach Angiospermae dochodzi do rozwoju nasienia bez zapłodnienia (autonomiczna apomiksja) lub przy zapłodnieniu tylko komórki centralnej (pseudogamiczna apomiksja). Potomstwo powstające z takich nasion dokładnie powtarza macierzysty genotyp (potomstwo apomiktyczne). Kluczowym problemem jest znalezienie mechanizmów odpowiedzialnych za inicjację rozwoju reprodukcyjnego u roślin okrytonasiennych. W ostatnich kilku latach odkryto, zidentyfikowano i sklonowano kilka genów: *FIS* (ang. fertilization independent seed; CHAUDHURY i współaut. 1997), *MEDEA* (*MEA*; GROSSNIKLAUS i współaut. 1998), *FIE* (ang. fertilization independent endosperm; OHAD i współaut. 1996), które wykazują gametofitowy efekt matczynej i wstrzymują rozwój nasienia, a w szczególności rozwój endospermy, dopóki nie dojdzie do zapłodnienia, nawet w przypadku, gdy nastąpiło zapylenie. Mutacje tych genów: *fis1*, *fis2*, *mea*, i *fie* powodują zahamowanie rozwoju bądź obumarcie zarodka (*fis1* lub *medea*), stymulują rozwój nasion (*fis2*) i endospermy (*fie*) bez zapłodnienia. Autonomiczne bielmo u mutantów *fie1* nie rozwijało się całkowicie. W porównaniu z bielmem form dzikich, rozwój był wyraźnie opóźniony, liczba jąder mniejsza, nie dochodziło do celularyzacji jak również nie obserwowano wyraźnego podziału na strefy charakterystyczne dla bielma *Arabidopsis*. Wykazano natomiast, że u słabo zmetylowanych mutantów *fie1* (ang. hypomethylated *fie1* mutants) autonomiczne bielmo rozwijało się dalej. Dochodziło do celularyzacji i regionalnej specyfikacji bielma podobnie jak w nasionach typu dzikiego. Tak więc kombinacja niskiego zmetylowanego genomu matczynej z utratą

funkcji genów *FIE* umożliwiła powstanie i różnicowanie się endospermy bez zapłodnienia (VINKENOOG i współaut. 2000).

Geny *MEA* i *FIE* kodują białka będące homologami białek *Drosophila* z grupy Polycomb (Pc-G), odpowiednio Enhancer of zeste E (Z) i Extra Sex Combs (ESC), które regulują ekspresję genów przez epigenetyczne wyciszenie (ang. epigenetic silencing) (KIYOSUE i współaut. 1999, OHAD i współaut., 1999, PREUSS 1999, SØRENSEN i współaut. 2000, SPILLANE i współaut. 2001).

W eksperymentach, w których promotory tych trzech genów łączono z genem reporterowym GUS (β -glikuronidaza) wykazano, że po zapłodnieniu aktywność genów *MEA*, *FIS2* i *FIE* jest wykrywalna w tkance endospermy, a aktywność *FIE* obecna jest również w innych sporofitycznych tkankach (LUO i współaut. 1999, 2000). Ekspresję wszystkich trzech genów obserwuje się w megagametoficie przed zapyleniem: produkty *MEA* i *FIS2* znaleziono w jądrach biegunowych, komórce centralnej i komórkach dzielącej się endospermy. Produkt fuzji genów *FIE::GUS* obecny był zarówno w komórce centralnej przed zapyleniem, jak i w rozwijającej się endospermie. Ekspresja tych genów w jądrach biegunowych i w komórce centralnej jest prawdopodobnie niezbędna dla represji rozwoju endospermy przed zapłodnieniem i innych procesów rozwojowych w nasieniu.

Regulacja wszystkich trzech genów *FIS* przebiega w taki sposób, że kopie tych genów pochodzące z komórki plemnikowej, nie ulegają ekspresji we wczesnych stadiach rozwoju nasienia (inaktywacja epigenetyczna); kontrola tej ekspresji nie jest związana z poziomem metylacji męskiego genomu. Zróżnicowana aktywność genów *MEA*, *FIS* i *FIE*, uwarunkowana pochodzeniem rodzicielskim, nie jest zależna od metylacji DNA, niemniej jednak metylacja kontroluje pewne geny, które odgrywają kluczową rolę w rozwoju nasienia (patrz GROSSNIKLAUS i współaut. 2001).

FUZJA KOMÓRKI CENTRALNEJ I KOMÓRKI PLEMNIKOWEJ *IN VITRO*

Po odkryciu podwójnego zapłodnienia przez wiele lat badania nad tym zjawiskiem u Angiospermae ograniczone były wyłącznie do

opisu, głównie ze względu na trudności metodyczne. Dopiero na początku lat 90. nastąpił przełom w badaniach nad zapłodnieniem u ro-

ślin okrytonasiennych. Na drodze eksperymentalnej, w warunkach ściśle kontrolowanych, stało się możliwe prześledzenie krok po kroku wczesnych etapów rozwoju zarodka i endospermy. Postępy badań nad zapłodnieniem w tej grupie roślin zostały omówione ostatnio (POPIELARSKA i PRZYWARA 1999, PRZYWARA i POPIELARSKA 1999, KRANZ 2001). Modelowym obiektem badań eksperymentalnych nad zapłodnieniem *in vitro* przy udziale izolowanych gamet stała się kukurydza, u której w 1991 r. dokonano pierwszej udanej fuzji (KRANZ i współau. 1991a, b)

Sto lat po odkryciu podwójnego zapłodnienia, w 1998 r. KRANZ i współpracownicy po raz pierwszy wyizolowali i dokonali fuzji komórki centralnej i komórki plemnikowej *in vitro* używając tkankę podobną do bielma. Dawało to szerokie możliwości badań aspektów fizjologicznych oraz podłoża genetycznego tego procesu. Pozwalało również na śledzenie kolejnych etapów zapłodnienia komórki centralnej z gametą męską w warunkach eksperymentalnych i dokonania porównań z tym procesem *in vivo*. Udało się ustalić że w warunkach *in vitro* (i) dochodzi do fuzji komórki plemnikowej z pojedynczymi jądrami biegunowymi, jak również z jądrem wtórnym, co jest zgodne z obserwacjami nad zapyleniem i zapłodnieniem *in vivo* u kukurydzy (MÓL i współaut. 1994); (ii) kariogamia w komórkach centralnych zachodzi w momencie fuzji gamet lub jest nieco przesunięta w czasie; zakończenie kariogamii następuje w 2 godziny po fuzji gamet; (iii) rozwój bielma po fuzji i kariogamii jest bardzo gwałtowny, podobnie jak to ma miejsce *in vivo*, przy czym rozwój ten jest szybszy w części bazalnej (mikropylarnej) niż w apikalnej (antypodalnej); (iv) celularyzacja bielma postę-

puje w kierunku centrypetalnym, poczynając od zewnętrznych partii, zgodnie z opisywaną u typowych roślin zbożowych do których należy kukurydza (patrz podrozdział Model Rozwoju Bielma). Formowanie się ścian w bielmie typu nuklearnego u traw rozpoczyna się wokół zarodka i rozprzestrzenia się w kierunku bieguna chalazalnego. W przypadku endospermy powstałej *in vitro* za rejon chalazalny można uznać wydłużoną część endospermy, bowiem ściany komórkowe zakładają się w kierunku tego bieguna, gdzie endosperma posiada charakterystyczne przewężenie. Wydłużona część endospermy zawiera duże komórki, które przypominają haustorium. W endospermie powstałej *in vivo* również opisywano tworzenie się haustorium w regionie chalazalnym; (v) komórka centralna zapłodniona i hodowana *in vitro* bez tkanek rośliny macierzystej jest zdolna do samoorganizacji podobnie jak zygota, która w warunkach *in vitro* może rozwinąć się w zarodek przy braku endospermy i innych somatycznych tkanek załączka (KRANZ i LÖRZ 1993); (vi) występują podobieństwa w drogach rozwojowych i w ekspresji genów zygot i zarodków oraz zapłodnionych komórek centralnych i endospermy. W obu strukturach można wyróżnić na jednym biegunie część globularną zbudowaną z małych komórek o gęstej cytoplazmie zaś na przeciwstawnym biegunie część wydłużoną z dużymi komórkami (są to komórki suspensora). KRANZ i współautorzy (1998) uważają globularny region obserwowany w endospermie *in vitro* za odpowiednik bieguna mikropylarnego *in vivo*; (vii) liczne i synchroniczne podziały komórek towarzyszą wczesnym stadiom rozwojowym endospermy *in vitro*, podobnie jak to ma miejsce *in vivo* (KOWLES i PHILLIPS 1988).

ENDOSPERM – NUTRITIVE TISSUE FOR EMBRYO I. ENDOSPERM AS THE RESULT OF DOUBLE FERTILIZATION IN ANGIOSPERMS (ANGIOSPERMEAE)

S u m m a r y

A review is given on advances in endosperm research in angiosperms. Endosperm is a very important nutritive tissue for the developing embryo. In sexually reproducing angiosperms endosperm develops as a consequence of double fertilization when one of male gametes is introduced to the central cell of megagametophyte. Of the three types of endosperm: nuclear, cellular and helobial, the nuclear pattern of development is most common and occurs in plants of major economic importance, including the cereals. Recently research is focused on processes and mecha-

nisms involved in endosperm development in species with the nuclear type of endosperm, including monocots (mainly cereals) and dicots (the model plant *Arabidopsis thaliana*). This model represents a highly conserved mode of nuclear endosperm differentiation with several stages: coenocytic, cellularization, differentiation, maturation and programmed death. In the differentiated endosperm four major cell types have been recognized: starchy endosperm, aleurone cells, transfer cells, and the cells of the embryo-surrounding region. The mechanisms involved

in the first two stages of endosperm development are very conserved among all groups of angiosperms; they involve nuclear migration during coenocytic stage and cell wall formation by cytoplasmic phragmoplasts. Also specification of cell fates *via* positional signaling and genetic basis of endosperm differentiation are reported. Several other topics are presented, such as en-

dosperm cytology, the nature and origin of endosperm dosage system, mutation *fie* in *Arabidopsis* that allows endosperm development without fertilization, and endosperm development *in vitro* after the fusion of an isolated sperm and isolated central cell.

LITERATURA

- BECRAFT P. W., BROWN R. C., LEMMON B. E., OLSEN O. A., OOSAHN FERSTAD H. G., 2001. *Endosperm development* [W:] *Current Trends in the Embryology of Angiosperms*. BHOJWANI S. S., SOH W. Y. (red.). Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 353-374.
- FERGER F., 1999. *Endosperm development*. *Plant Biol.* 2, 28-32.
- BONELLO J. F., OOSAHN-FERSTAD H. G., PEREZ P., DUMAS C., ROGOWSKI P., 2000. *Esr genes show different levels of expression in the same region of maize endosperm*. *Gene* 246, 219-227.
- BROWN R., LEMMON B. E., OLSEN O. A., 1994. *Endosperm development in barley: microtubule involvement in the morphogenetic pathway*. *Plant Cell* 6, 1241-1252.
- BROWN R., LEMMON B. E., OLSEN O. A., 1996a. *Polarization predicts the pattern of cellularization endosperm in cereal*. *Protoplasma* 192, 168-177.
- BROWN R., LEMMON B. E., OLSEN O. A., 1996b. *Development of endosperm in rice (Oryza sativa L.): Cellularization*. *J. Plant Res.* 109, 301-313.
- BROWN R., LEMMON B. E., NGUYEN H., OLSEN O. A., 1999. *Development of endosperm in Arabidopsis thaliana*. *Sex. Plant Reprod.* 12, 32-42.
- CHAUDHURY A. M., MING L., MILLER C., CRAIG S., DENNIS E. S., PEACOCK W. J., 1997. *Fertilization independent seed development in Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4223-4228.
- CRESTI M., LINSKENS H. F., 1999. *The discovery of sexual reproduction in higher plants*. *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* 41, 19-29.
- DOAN D. N., LINNESTAD C., OLSEN O. A., 1996. *Isolation of molecular markers from the barley endosperm coenocyt and the surrounding nucellus layers*. *Plant Mol. Biol.* 31, 173-886.
- DOYLE J. A. 1996. *Seed plant phylogeny and the relationship of Gnetales*. *Intl. J. Plant Sci.* 15, S3-S39.
- EHLENFELD M. K., ORITZ R., 1995. *Evidence on the nature and origins of endosperm dosage requirements in Solanum and other angiosperm genera*. *Sex. Plant Reprod.* 8, 189-196.
- FRIEDMAN W. E., 1990. *Double fertilization in Ephedra, a non-flowering seed plant: its bearing on the origin of angiosperms*. *Science* 247, 951-954.
- FRIEDMAN W. E., 1992. *Evidence of pre-angiosperm origin of endosperm: implication for the evolution of flowering plants*. *Science* 225, 336-339.
- FRIEDMAN W. E., 1994. *The evolution of embryogeny in seed plants and the developmental origin and early history of endosperm*. *Am. J. Bot.* 81, 1468-1486.
- FRIEDMAN W. E., 1995. *Organismal duplication, inclusive fitness theory, and altruism: Understanding the evolution of endosperm and the angiosperm reproductive syndrome*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3913-3917.
- FRIEDMAN W. E., 1998. *The evolution of double fertilization and endosperm: an "historical" perspective*. *Sex. Plant Reprod.* 11, 6-16.
- FRIEDMAN W. E., CARMICHEL I. S., 1996. *Double fertilization in Gnetales: implications for understanding reproductive diversification among seed plants*. *Intl. J. Plant Sci. (Suppl.)* 157, 74-79.
- GABARA B., 2001. *Endopoliploidy* [W:] *Podstawy Biologii Komórki Roślinnej*. WO NY A., MICHEJDA J., RATAJCZAK L. (red.). Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań, 201-211.
- GROSSNIKLAS U., VIELLE-CALZADA J. P., HOEPNER M. A., GAGLIANO W. B., 1998. *Maternal control of embryogenesis by MEDEA a polycomb group gene in Arabidopsis*. *Science* 280, 446-450.
- HAIGH D., WESTOBY M., 1991. *Genomic imprinting in endosperm: its effect on seed development in crosses between species, and between different ploidies of the same species, and its implications for the evolution of apomixis*. *Philos. Trans. R. Soc. London* 333, 1-13.
- HERR J. M., Jr., 1999. *Endosperm development in Arabidopsis thaliana (L.)*. *Heynh. Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* 41, 103-109.
- HU S. Y., 1998. *Centenary on S.G. Nawaschin's discovery of double fertilization: retrospects and prospects*. *Acta Bot. Sin.* 40, 1-13.
- HUEROS G., ROYO J., MAITZ M., SLAMINI F., THOMPSON R. D., 1999. *Evidence for factors regulating transfer cell-specific expression in maize endosperm*. *Plant Mol. Biol.* 41, 403-414.
- JENSEN W. A., 1998. *Double fertilization: a personal view*. *Sex. Plant Reprod.* 11, 1-5.
- JOHNSON S. A., 1980. *The role and nature of genic balance in endosperm development*. *Praca doktorska, University of Wisconsin, Madison*.
- JOHNSON S.A., HANNEMAN R.E., Jr., 1999. *The nature of genetic control of endosperm balance number based on aneuploid analysis of Datura*. *Sex. Plant Reprod.* 12, 71-75.
- KIYOSUE T., OHAD N., YADEGARI R., HANNON M., DINNEY M., WELLS D., KATZ A., MAGROSSIAN L., HARADA J. J., GOLDBERG R. B., FISCHER R. L., 1999. *Control of fertilization-independent endosperm by the MEDEA polycomb gene in Arabidopsis*. *Plant Biol.* 96, 4186-4191.
- KOWLES R. V., PHILLIPS R. L., 1988. *Endosperm development in maize*. *Intl. Rev. Cytol.* 112, 97-136.

- KRANZ E., 2001. *In vitro fertilization*. [W:] *Current Trends in the Embryology of Angiosperms*. BHOJWANT S. S., SOH W. Y. (red.). Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 143–166.
- KRANZ E., LÖRZ H., 1993. *In vitro fertilization with isolated, single gametes results in zygotic embryogenesis and fertile maize plants*. *Plant Cell* 5, 739–746.
- KRANZ E., BAUTOR J., LÖRZ H., 1991a. *In vitro fertilization of single isolated gametes of maize mediated by electrofusion*. *Sex. Plant Reprod.* 4, 12–16.
- KRANZ E., BAUTOR J., LÖRZ H., 1991b. *Electrofusion-mediated transmission of cytoplasmic organelles through the in vitro fertilization process, fusion of sperm cells with synergids and central cells, and cell reconstitution in maize*. *Sex. Plant Reprod.* 4, 17–21.
- KRANZ E., VON WIEGEN P., QUADER H., LÖRZ H., 1998. *Endosperm development after fusion isolated, single maize sperm and central cells in vitro*. *Plant Cell* 10, 511–524.
- LEŚNIEWSKA J., SIMEONOVA E., SIKORA E., 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.
- LOPES M. A., LARKINS B. A., 1993. *Endosperm origin, development, and function*. *Plant Cell* 5, 1383–1399.
- LUO M., BILODEAU P., KOLTUNOW A., DENNIS E. S., PEACOC W. J., CHAUDHURY A. M., 1999. *Genes controlling fertilization-independent seed development in Arabidopsis thaliana*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96, 296–300.
- LUO M., BILODEAU P., KOLTUNOW A., DENNIS E. S., PEACOC W. J., CHAUDHURY A. M., 2000. *Expression and parent-of-origin effects for FIS2, MEA, and FIE in the endosperm and embryo of developing Arabidopsis seeds*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97, 10637–10642.
- MACKIEWICZ T., 1973. *Gametogenesis, embryo-sac development and pollen grain morphology in Brassica oleracea var. capitata L. x Brassica oleracea var. acephala DC. Hybrid – as compared with the paternal forms*. *Genet. Pol.* 14, 12–19.
- MAŁUSZYŃSKA J., 1999. *Przemiany chromosomowe towarzyszące różnicowaniu komórek roślinnych*. *Post. Biol. Kom.* 26, 127–136.
- MARCINIAK K., 1991. *DNA endoreplication level and in cotyledons during seed development in three dicotyledonous species*. *Acta Soc. Bot. Pol.* 60, 273–284.
- MARCINIAK K., 1993. *DNA endoreplication level in endosperm during seed development in three monocotyledonous species*. *Acta Soc. Bot. Pol.* 62, 143–147.
- MÓL R., MATTHYS-ROCHON E., DUMAS C., 1994. *The kinetics of cytological events during double fertilization in Zea mays L.* *Plant J.* 5, 197–206.
- NAGL W., 1978. *Endopolyploidy and Polyteny in Differentiation and Evolution*. Elsevier, Amsterdam.
- NGUYEN H., BROWN R. C., LEMMON B. E., 2000. *The specialized chalazal endosperm in Arabidopsis thaliana and Lepidium virginicum (Brassicaceae)*. *Protoplasma* 212, 99–110.
- OHAD N., MAGROSSIAN L., HSU Y. C., WILLIAMS C., REPPETI P., FISCHER R. L., 1996. *A mutation that allow endosperm development without fertilization*. *Plant Biol.* 93, 5319–5324.
- OHAD N., YADEGARI R., MAGROSSIAN L., HANNON M., HARADA J. J., GOLDBERG R. B., FISCHER R. L., 1999. *Mutation in FIE polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization*. *Plant Cell* 11, 407–416.
- OLSEN O. A., 1998. *Endosperm development*. *Plant Cell* 10, 485–487.
- OLSEN O. A., 2001. *Endosperm development: Cellularization and cell fate specification*. *Ann. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 233–267.
- OLSEN O. A., LEMMON B. E., BROWN R. C., 1995. *The role of cytoskeleton in barley endosperm cell wall deposition*. *BioEssays* 17, 803–812.
- OLSEN O. A., LINNESTAD C., NICHOLS S. E., 1999. *Developmental biology of the cereal endosperm*. *Trends Plant Sci.* 4, 253–257.
- OLSZEWSKA M., (red.), 1999. *Podstawy Cytogenetyki Roślin*. PWN, Warszawa.
- OPSAHL-FERSTAD H. G., LE DEUNFF E., DUMAS C., ROGOWSKY P. M., 1997. *ZmEsr, a novel endosperm-specific gene expressed in a restricted region around the maize embryo*. *Plant J.* 12, 235–246.
- POPIELARSKA M., PRZYWARA L., 1999. *Postępy w badaniach nad zapłodnieniem u roślin okrytonasiennych (Angiospermae): I. Zapłodnienie in vitro z użyciem izolowanych gamet*. *Post. Biol. Kom.* 26, 795–809.
- PREUSS D., 1999. *Chromatin silencing and Arabidopsis development: a role for polycomb proteins*. *Plant Cell* 11, 765–767.
- PRZYWARA L., POPIELARSKA M., 1999. *Postępy w badaniach nad zapłodnieniem u roślin okrytonasiennych (Angiospermae): II. Biochemiczne i molekularne aspekty zapłodnienia*. *Post. Biol. Kom.* 26, 811–827.
- RODKIEWICZ B., 1973. *Embriologia Roślin Kwiatowych*. PWN, Warszawa.
- RODKIEWICZ B., 1984. *Embriologia Roślin Nagolazkowych*. PWN, Warszawa.
- RODKIEWICZ B., ŚNIEŻKO R., FYK B., NIEWGŁOWSKA B., TCHÓRZEWSKA D., 1996. *Embriologia Angiospermae Rowojowa i Eksperymentalna*. Wydawnictwo Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin.
- ROJEK J., 2000. *Indukcja autonomicznej endospermy w kulturze niezapylnych zalążni Brassica napus cv. Topas*. Praca Magisterska, Uniwersytet Jagielloński, Kraków.
- RUSSEL S. D., 1991. *Isolation and characterisation of sperm cells in flowering plants*. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 189–204.
- RUSSEL S. D., 1992. *Double fertilization*. *Int. Rev. Cytol.* 140, 357–388.
- RUSSEL S. D., 1996. *Attraction and transport of male gametes for fertilization*. *Sex. Plant Reprod.* 9, 337–342.
- RYCHLEWSKI J., 1968. *Kariologia endospermy roślin okrytonasiennych. I. Geneza wyjściowych liczb chromosomów*. *Wiad. Bot.* 12, 257–269.

- RYCHLEWSKI J., 1969. *Kariologia endospermy roślin okrytonasiennych. II. Procesy różnicowania jąder*. Wiad. Bot. 13, 43–53.
- SCHL J. H., KIEFF N. H., VAN LAMMEREN A., 1984. *Interaction between embryo and endosperm during early developmental stages of maize caryopses (Zea mays)*. Can. J. Bot. 62, 2842–2853.
- SØRENSEN M.B., CHAUDHURY A. M., ROBERT H., BANCHAREL E., FERGER F., 2001. *Polycomb group genes control pattern formation in plant seed*. Curr. Biol. 11, 277–281.
- SPILLANE C., MACDOUGAL C., STOCK C., KÖHLER C., VELLE-CALZADA J-P., NUNES S. M., GROSSNIKLAUS U., GOODRICH J., 2000. *Interaction of the Arabidopsis Polycomb group proteins FIE and MEA mediates their common phenotypes*. Curr. Biol. 10, 1535–1538.
- TIAN H. Q., RUSSEL S. D., 1998. *The fusion of sperm cells and the function of male germ unit (MGU) of tobacco (Nicotiana tabacum L.)*. Sex. Plant Reprod. 11, 171–176.
- TRELA Z., 1963. *Cytological studies in the differentiation of the endosperm in Anemone nemorosa L.* Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. 6, 177–183.
- TURAŁA K., 1969. *Chromosomy olbrzymie u roślin*. Wiad. Bot. 13, 33–42.
- TURAŁA-SZYBOWSKA K., 1974. *Z ostatnich badań nad endomitozą*. Wiad. Bot. 18, 47–53.
- TURAŁA-SZYBOWSKA K., 1979. *Endopoloidalność i jej znaczenie w różnicowaniu* Wiad. Bot. 23, 205–213.
- TURAŁA-SZYBOWSKA K., 1986. *Endoreduplikacja – endomitoza – zahamowana profaza u Angiospermae (dyskusja nad terminologią w świetle ostatnich badań)*. Wiad. Bot. 30, 139–144.
- VAN LAMMEREN A. A. M., 1988. *Structure and function of the microtubular cytoskeleton during endosperm development in wheat: An immunofluorescence study*. Protoplasma 146, 18–27.
- VIJAYARAGHA VAN M. R., PRABHAKAR K., 1984. *The endosperm*. [W]: *Embryology of Angiosperms*. JOHRI B. M. (red.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 319–376.
- VINKENOOG R., SCOTT R. J., 2001. *Autonomous endosperm development in flowering plants: how to overcome the imprinting problem?* Sex. Plant Reprod. 14, 189–194.
- VINKENOOG R., SPIELMAN M., ADAMS S., FISCHER R.L., DICKINSON H. G., SCOTT R. J., 2000. *Hypomethylation promotes autonomous endosperm development and rescues postfertilization lethality in fie mutants*. Plant Cell 12, 2271–2282.
- WOJCIECHOWSKA M., 2001. *Symptomy programowanej śmierci komórek podczas rozwoju roślin*. Post. Biol. Kom. 28, 317–333.
- YOUNG T. E., GALIE D. R., 1999. *Analysis of programmed cell death in wheat endosperm reveals difference in endosperm development between cereals*. Mol. Biol. 39, 915–926.
- YOUNG T. E., GALIE D. R., DEMASON D. A., 1997. *Ethylene-mediated programmed cell death during maize endosperm development of wild type and shrunken2 genotypes*. Plant Physiol. 115, 737–751.