

ZNAMIE I PYŁEK – PRZEGLĄD PRAC DOTYCZĄCYCH ZGODNEGO ZAPYLENIA

Stigma and pollen – the review concerning with compatible pollination

Renata ŚNIEŻKO, Krystyna WINIARCZYK

Summary. Stigma and pollen are the partners at the first moment of sexual recognition. Their contact evolves very important interactions in female and male cells which consequently can inhibit or stimulate the growth of the pollen tube. The surface of the stigma creates special environment for compatible pollen grains allowing them to germinate and at the same time the germination of the incompatible pollen is inhibited. Pollen on its side cooperates with stigma, gives some signals and reacts on stimuli from stigmatic cells. These interactions are very intensely investigated by electron microscopy and biochemical techniques. Present paper collects some of recent research on pollen–stigma interactions, but is not particularly concerned with the incompatibility problems.

Key words: stigmatic exudates, pollination, pollen germination, pollen recognition.

Doc. dr hab. Renata Śnieżko, mgr Krystyna Winiarczyk, Instytut Biologii, Uniwersytet M. Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20–033 Lublin

WSTĘP

Większość roślin okrytonasiennych ma kwiaty obupłciowe tzn., że w kwiecie rozwijają się pręciki, a w nich pyłek (gametofit męski niosący gamety, czyli komórki plemnikowe) i słupek z zalążkami, w których rozwijają się woreczki zalążkowe (gametofit żeński z komórką jajową – gametą). Wydawałoby się, że jest to przystosowanie do zapylania słupka pyłkiem tego samego kwiatu, lecz tak nie jest. Pomimo sąsiedztwa organów żeńskich i męskich rośliny wydają najczęściej nasion po zapyleniu obcym pyłkiem – z innego osobnika tego samego gatunku, zaś zapylenie własnym pyłkiem najczęściej bywa nieskuteczne. Zjawisko to określane jako samoniezgodność (ang. selfincompatibility) jest od wielu lat szczegółowo badane, gdyż ma wielkie znaczenie w zabiegach hodowlanych. Obok różno-

rodnych barier zapobiegających zapyleniu własnym pyłkiem istnieją mechanizmy uniemożliwiające zapłodnienie gametami pyłku innych gatunków. Te mechanizmy określa się jako niezgodność międzygatunkową lub międzyodmianową. Zatem rośliny wytworzyły różnorodne mechanizmy zapobiegające samozapyleniu, czyli wytwarzaniu potomstwa na drodze chowu wsobnego. Wiele mechanizmów dotyczy bezpośredniego kontaktu pyłku lub łagiewki pyłkowej i tkanek słupka. Jeśli w wyniku kontaktu dochodzi do zablokowania kiełkowania i wzrostu łagiewki uważa się, że pyłek i znamie nie są zgodne, dla uproszczenia termin niezgodny stosuje się przeważnie do pyłku.

Aby doszło do zapłodnienia zgodny pyłek musi znaleźć się na znamieniu i wykiełkować, a łagiewka wrosnąć przez tkanki słupka do woreczka zalążkowego. Również u wielu roślin roz-

mnażających się apomiktycznie stwierdzono, że zapylenie odpowiednim pyłkiem i prawidłowy wzrost łagiewek pyłkowych jest nieodzowny do wytworzenia nasion, chociaż nie następuje tu zjawisko połączenia komórki plemnikowej z komórką jajową, to niezbędne jest zapłodnienie jądra wtórnego komórki centralnej (pseudogamia). Bardzo istotny jest moment zetknięcia się ziaren pyłku z komórkami znamienia. Warunkuje on szereg procesów decydujących o tym, czy pyłek będzie mógł wykiełkować a łagiewka wrosnąć w tkanki słupka. Mechanizmy fizjologiczne występujące w ziarnie pyłku i w komórkach znamienia są bardzo skomplikowane i wzajemnie uzależnione. Obecnie procesy te bada się przy pomocy różnych technik mikroskopii elektronowej oraz metodami biochemicznymi i cytochemicznymi. Część tych badań, głównie dotyczących reakcji ziarna pyłku i komórek znamienia po zgodnym zapyleniu, została przedstawiona w niniejszej pracy.

ZNAMIE

Znamie może być zbudowane w różny, niekiedy bardzo specyficzny sposób, w zależności od biologii zapyłania danego gatunku. Przez wiele lat badania nad strukturą znamion koncentrowały się głównie na ich morfologii, jako jednej z cech taksonomicznych. Obecnie przeważa pogląd, że budowa znamion wynika z przystosowań do sposobu zapyłania [21, 24].

Na powierzchni znamion występują strefy o różnej zdolności zatrzymywania ziaren pyłku. Strefy te mogą różnić się kształtem, budową epidermy lub stopniem pokrycia wydzieliną. Receptywne komórki mogą być rozproszone na całym znamieniu lub też koncentrować się w wydzielonych regionach w postaci pasm lub grup np. u *Nicotiana* występują one jedynie w centralnej części tzw. bruzdzie, natomiast u *Arachis cardenasii* tylko na obrzeżu [26, 29]. Bardzo zróżnicowany jest kształt znamion i układ powierzchni receptywnych np. u przedstawicieli rodziny Bromeliaceae; zbadano znamiona 158 gatunków z 26 rodzajów i wyróżniono 3 typy

znamion, przy czym jeden z typów rozdzielono na dwa podtypy. Należy zaznaczyć iż omawiana klasyfikacja została oparta na różnych przystosowaniach do zapyłania przez nietoperze [41].

Kształt i rozmiary papilli oraz odległości między ich wierzchołkami są dostosowane do rozmiarów ziaren i urzeźbienia egzyny pyłku, co potwierdza pogląd o adaptacyjnym charakterze cech morfologicznych znamion [22, 29, 30]. Strukturalne i fizjologiczne cechy powierzchni zatrzymującej pyłek różnią się znacznie między poszczególnymi rodzinami. Niekiedy są one podobne u roślin nie spokrewnionych, np. u *Dracaena* (Liliaceae) i *Oenothera organensis* (Onagraceae), u których dojrzałe znamie ma powierzchnię receptywną z licznymi komórkami nekrotycznymi [21]. Komórki nekrotyczne występują licznie na receptywnych znamionach 5 gatunków *Prunus*, zaś u *Malus* i *Pyrus* tylko niektóre komórki zamierają zanim nastąpi zapylenie [9]. U wielu roślin papille szybko degenerują po zapyleniu [18, 59].

Wykazano zależności między charakterem powierzchni receptywnej a systemem niezgodności. I tak sporofityczny system samoniezgodności został stwierdzony u roślin o suchym, brodawkowatym znamieniu, zaś niezgodności gametofitycznej najczęściej towarzyszy mokre znamie. Na suchym znamieniu łatwiej kiełkuje pyłek trójkomórkowy, zaś znamie mokre stanowi bardziej odpowiednie podłoże dla pyłku dwukomórkowego, chociaż pyłek dwukomórkowy występuje zarówno u roślin o znamionach typu mokrego jak i typu suchego [24, 39].

PAPILLE I WARSTWA SUBEPIDERMALNA ZNAMIENTA

Powierzchnia znamienia jest pokryta epidermą. Budowa epidermy zmienia się podczas osiągnięcia przez znamie stanu receptywności. Komórki epidermy mogą przekształcać się w jedno – lub wielokomórkowe papille, najczęściej buławkowate, rozdęte u podstawy. Przed okresem pełnej receptywności papille często ściśle przylegają do siebie, a na dojrzałym znamieniu ich wierzchołki są rozsunięte. Tego typu papille wy-

kształcają się na znamionach przedstawicieli rodziny Cruciferae [37, 50], Solanaceae [12, 26, 30], czy też u *Olea europea* [6], *Hypericum calycinum* [44]. Natomiast u *Citrus limon* papille są jedno lub kilkukomórkowe przez co warstwa receptywna jest stosunkowo gruba [10]. Papille złożone z paru komórek, mogą być niekiedy rozgałęzione np. u przedstawicieli rodziny Bromeliaceae [41]. Stosunkowo nieliczne są rośliny, których znamię nie ma papilli np. mango [57]. U *Dendrobium speciosum* oprócz papilli na znamieniu obserwowane były oderwane od nich komórki. Pływają one w śluzie pokrywającym znamię i stosunkowo długo pozostają żywe. Na młodych znamionach są to szczytowe komórki papilli, które mają charakter wydzielniczy [48].

Młode papille okrywa kutikula, zaś dojrzałe dodatkowo powleka warstwa lepkiej wydzieliny. Papille w miarę dojrzewania wykazują coraz silniejszą aktywność wydzielniczą. Najpierw pod kutikulą pojawiają się drobne kropelki wydzieliny, dobrze widoczne w mikroskopie skaningowym, a z czasem jest ich na tyle dużo, że zlewają się ze sobą, rozrywają kutikulę i wylewają na jej powierzchnię. Wydzielina pokrywa cienką warstwą papille na znamionach typu suchego [6, 9], zaś grubszą warstwą gęstego płynu (głównie lipidy, białka, cukry i związki fenolowe) na znamionach typu mokrego [10, 12, 26, 27, 29, 58].

Znamiona kilkunastu gatunków roślin przebadano przy użyciu mikroskopów elektronowych (transmisyjny i skaningowy). Podczas dojrzewania znamienia prześledzono dokładnie zmiany ultrastruktury komórek zarówno epidermy jak i tkanki leżącej pod nią. Pewne obserwacje są zgodne dla szeregu gatunków. Zarówno w papillach, jak i w znajdujących się pod nimi komórkach cytoplazma początkowo zawiera wiele cystern szorstkiego retikulum endoplazmatycznego. W chwili, kiedy rozpoczyna się wydzielanie eksudatu charakter retikulum zmienia się, pojawiają się liczne gładkie cysterny i pęcherzyki. Niekiedy równocześnie nasila się aktywność diktiosomów, np. u *Lycopersicon peruvianum* i *Dendrobium speciosum* [12, 48]. Przy plazmo-

lemmie od strony cytoplazmy i na zewnątrz pojawiają się globule elektronogęste. W nieco starszym stadium duże osmofilne globule widać poza ścianą komórkową na powierzchni papilli i w przestrzeniach między komórkami subepidermalnymi znamienia. W cytoplazmie komórek wydzielających eksudat lipidopodobne substancje występują w cysternach gładkiego retikulum i w licznych pęcherzykach, a także w stromie plastydów. We wcześniejszych stadiach obserwowano amyloplasty z jednym lub kilkoma niedużymi ziarnami skrobi. Natomiast kiedy rozpoczyna się wydzielanie eksudatu, skrobia w plastydach stopniowo zanika, pojawiają się plastoglobule lipidowe. Aktywność wydzielnicza papilli *Lycopersicon* zmienia się w miarę ich dojrzewania. Młode papille są owalne, wydłużone w kierunku prostopadłym do powierzchni znamienia, podobnie jak u *Nicotiana*, czy *Sinapis*. Gęsta cytoplazma wypełnia nasadową część omawianych komórek, zaś w części szczytowej znajduje się wakuola. Papille rozpoczynają wydzielanie eksudatu w części podstawowej, co można zaobserwować przy użyciu transmisyjnego i skaningowego mikroskopu elektronowego – kropelki wydzieliny wydostają się na zewnątrz ściany komórkowej u podstawy. Papille rozrastają się w nasadowej części, i uzyskują kształt gruszkowaty, ich wierzchołki rozchylają się. Następuje to bezpośrednio przed stadium otwierania się kwiatu (anteza) wydzielina pojawia się także na ścianach bliżej wierzchołka papilli. Nasila się wydzielanie z komórek subepidermalnych i w momencie rozpoczęcia stadium otwierania się kwiatu albo wkrótce po nim znamię pokrywa się ciągłą warstwą wydzieliny [10, 27, 30].

U *Olea* i *Citrus* aktywność wydzielniczą wykazują tylko komórki położone pod powierzchnią znamienia, zaś papille nie wykazują takiej aktywności. Nie mają one rozbudowanego obfitego retikulum ani aktywnych diktiosomów. W szczytowej części papilli *Citrus* i *Hypericum calycinum* znajduje się wakuola, która zawiera taniny [6, 44]. Zarówno w jądrach komórkowych papilli jak i komórek znajdujących się pod nimi

stwierdzono występowanie białkowych ciał parakrystalicznych o niewyjaśnionej funkcji. Komórki subepidermalne są połączone licznymi plazmodesmami przenikającymi przez stosunkowo grube ściany. Tkanka pod powierzchnią receptywną zachowuje zwartość do chwili całkowitej maceracji blaszek środkowych i rozpulchnienia ścian, co następuje podczas kiełkowania łagiewek. Kutikula na znamieniu zostaje przzerwana przez gromadzącą się pod nią wydzielinę. Po przzerwaniu kutikuli wydzielina wylewa się na powierzchnię i stopniowo pokrywa papille [6, 10].

Po zapyleniu aktywność wydzielnicza znamienia może być zahamowana np. u moreli [13], lub wzmacnia się jak np. u róży [51].

SKŁAD WYDZIELINY NA ZNAMIENTU

Komórki dojrzewającego znamienia i dojrzałego słupka wydzielają złożone substancje, które pokrywają jego powierzchnię i gromadzą się w przestworach międzykomórkowych.

Różnorodna jest rola wydzieliny pokrywającej znamię. Na znamieniu typu suchego wydzielina stanowi warstwę tak ciekłą, że nie rozrywa ona kutikuli [44], która musi być nadtrawiona przez enzymy pochodzące z pyłku lub wierzchołka łagiewki [19], albo zostaje mechanicznie przzerwana u podstawy papilli, kiedy one rozrastają się [44]. Stanowi ona płynną kutikulę chroniącą papille przed wysuszeniem i utrzymującą na ich ścianach warstwę wody potrzebną do kiełkowania pyłku. Sama wydzielina ma duże napięcie powierzchniowe, nie rozpuszcza się w wodzie, ani nie jest przez nią zmywana. Na obu typach znamion jest lepka, co ułatwia osadzanie się pyłku. W składzie chemicznym wydzieliny, obu typów znamion, dominują substancje lipidowe. Na mokrych znamionach wydzielina jest bardzo obfita, wypływa ponad kutikulę, a jej skład chemiczny jest bogatszy w białka i węglowodany.

U *Acacia retinoides* w stadium otwierania się kwiatu znamię jest receptywne i pokryte wydzieliną. W skład wydzieliny wchodzi nasycone i nienasycone tłuszcze, wolne kwasy tłuszczowe, flawonoidy, węglowodany, białka i związki

fenolowe [27]. Flawonoidy specyficznie oddziałujące na kiełkowanie pyłku wyekstrahowano z wydzieliny znamienia *Brassica oleracea* [43]. U *Citrus* w wydzielinie stwierdzono obecność 12 kwasów tłuszczowych oraz 7 klas innych lipidów, w tym 3 zawierały związki nienasycone. Najwięcej było w wydzielinie kwasu palmitynowego (27%), najmniej laurowego i stearynowego (po 1%). U *Forsythia intermedia* w wydzielinie wykryto 16 różnych kwasów tłuszczowych o podobnej długości łańcuchów węglowych (11–24 atomów), zaś u *Ipomea batatas* tylko 4 niskocząsteczkowe kwasy [53].

Znamię *Solanum tuberosum* jest także receptywne w stadium antezy. Jeszcze przed otwarciem kwiatu sekrecja rozpoczyna się od powstania osmofilnych granuli w cytoplazmie komórek znamienia i wydzielanie kropelek poza ścianę komórkową papilli. Płynna wydzielina podnosi kutikulę, następnie rozrywa ją i wypływa do przestworów międzykomórkowych na powierzchnię znamienia. Cytochemicznie wydzielina ma naturę tłuszczową, barwi się Sudanem czarnym i czerwienią Nilu, natomiast nie daje pozytywnej reakcji PAS ani reakcji na białka. Elektroforetycznie wykazano jednak, że w skład wydzieliny wchodzi także 3 polipeptydy [30].

U *Lycopersicon peruvianum* wydzielina na znamieniu jest hydrofobowa i bogata w lipidy, zaś obecny w szyjce i zalążni śluz jest hydrofilny, bogaty w arabinogalaktany, lecz ubogi w białka [12]. Skład wydzieliny na znamieniu zmienia się w trakcie dojrzewania znamienia. Najpierw wydzielina ma charakter tylko tłuszczowy i jest wydzielana zarówno przez komórki subepidermalne jak i u podstawy papilli. W okresie pełnej dojrzałości znamienia, kiedy wydzielina pojawia się na wierzchołkach papilli w jej składzie występują też węglowodany i białka [10, 12, 48, 53].

Na dojrzałym znamieniu u *Nicotiana sylvestris* w wydzielinie stwierdzono obecność tłuszczów, białek i cukrów, które jako mono- i dimery powstają w wyniku rozpadu blaszek środkowych. Receptywne znamię daje pozytywną reakcję na aktywność esterazy [26].

W wydzielinie u *Gasteria verucosa* wyodrębniono także białka i cukry, których ilość zwiększa się w miarę dojrzewania znamienia. Wydzielina jest najobfitsza w czasie, gdy woreczki zalążkowe są już zdolne do zapłodnienia [58].

W znamionach *Arachis* zarówno pod epidermą jak i w przestworach międzykomórkowych stwierdzono obecność enzymów hydrolitycznych typu fosfataz, esteraz i peroksydaz. Również pasmo tkanki transmisyjnej znajdującej się poniżej znamienia wykazywało wyraźną reakcję na białka w przestworach międzykomórkowych [29].

Powierzchnia receptywna na znamieniu *Dendrobium speciosum* jest wklęsła, a zagłębienie wypełnia gęsty śluz. Jego skład chemiczny różni się od innych wydzielin bardzo dużą zawartością kwaśnych węglowodanów i białek, a także zawartością kompleksów białkowo-cukrowych. W śluzie ok. 20% stanowią arabinogalaktyki, którym przypisuje się aktywną rolę zarówno w reakcjach rozpoznawania jak i hydratacji pyłku [48].

Analizy składu chemicznego wydzielin pozwalają stwierdzić, że przeważają w nich związki lipidowe, zaś węglowodany i białka stanowią tylko domieszkę, która prawdopodobnie decyduje o specyficznych cechach znamienia i odgrywa rolę w reakcjach rozpoznawania pyłku. Charakter lipidowy wydzieliny to pojęcie ogólne, jego skład może być bardzo różny nawet u gatunków należących do tej samej rodziny. Ponadto na słupku tej samej rośliny niekiedy obserwuje się różnice w składzie chemicznym wydzielin porównując ich skład we wcześniejszym okresie rozwoju ze składem wydzielin w pełni dojrzałych znamion.

Znacznie mniej jest dostępnych danych dotyczących składu wydzielin na znamionach typu suchego. Stanowią one znacznie cieńszą warstwę i nie dają się oddzielić od kutikuli, która ma także charakter tłuszczowy. W analizach biochemicznych trudno ocenić, który składnik pochodzi z wydzieliny, a który z kutikuli. Znamiona suche pokrywa niekiedy bardzo cienka warstwa białek i glikoproteidów – pelikula [44].

INTERAKCJE PYLEK – ZNAMIE

ROZPOZNAWANIE ZGODNOŚCI MIĘDZY PYŁKIEM A ZNAMIENIEM

Powierzchnia znamienia odznacza się nie tylko pewnymi właściwościami ułatwiającymi osadzanie i utrzymywanie się pyłku, ale występują tu również warunki sprzyjające kiełkowaniu zgodnego pyłku własnego gatunku, jak też czynniki zapobiegające kiełkowaniu pyłku lub rozwojowi łagiewek innych gatunków. Prawdopodobnie większość znamion spełnia ten warunek. Bardzo wiele badań zmierza do wyjaśnienia mechanizmów fizjologicznych reakcji rozpoznawania i ewentualnych reakcji niezgodności. Problem jest na tyle złożony, że w niniejszej publikacji będzie on potraktowany jedynie po bieźnie [8, 15, 17, 23, 24].

U *Cosmos*, *Helianthus*, *Brassica* i *Sinapis* zgodny i niezgodny pyłek można rozpoznać bezpośrednio po wykiełkowaniu na znamieniu. Kaloza gromadzi się w rozwijającej się łagiewce pyłkowej, a także w komórce znamienia w miejscu kontaktu z niezgodnym ziarnem pyłku [24, 46, 51].

U *Brassica oleracea* charakteryzującej się sporofityczną samoniezgodnością obserwowano „odrzućcie” pyłku przez znamie, czyli brak możliwości kiełkowania lub też „uwięzienie” krótkiej łagiewki pyłkowej zanim wrośnie ona w ścianę papilli. Podobnie po samozapyleńu u samoniezgodnej *Sinapis alba* – łagiewki pyłkowe kiełkują, ale nie wrastają w znamie, lecz pozostają krótkie i poskręcane wokół ziarna pyłku [51]. „Odrzucony” pyłek *Brassica* może być „uratowany” przez przeniesienie go na inne, zgodne znamie, na którym jest on zdolny wykiełkować po 4 godzinach [37]. Wskazywałoby to na obecność w znamieniu substancji hamujących wrastanie łagiewki pyłkowej w tkanki słupka.

KONTAKT ZIARNA PYŁKU Z PAPIŁĄ

Ziarno pyłku podczas przenoszenia na znamie jest odwodnione i metabolicznie nieaktywne. Takie „uśpione” ziarno przylega lub przyle-

pia się do powierzchni znamienia w sposób bierny. Pyłek w zetknięciu ze znamieniem najczęściej styka się z jedną lub paroma komórkami. Należy zaznaczyć iż w momencie zetknięcia ziarna pyłku z papillą nie cała jej powierzchnia jest jednakowo receptywna dla pyłku. Eksperymentalne badania receptywności papilli na znamieniu *Tradescantia* sp. wykazały, że przepuszczalność ich ścian jest większa w środkowej części niż w części wierzchołkowej. Kiedy pojedynczy pyłek przylepia się do szczytu papilli, to nie następuje żadna reakcja, kiedy zaś styka się z nią w części środkowej lub bliżej jej podstawy, to przyczepia się trwale i stosunkowo szybko kiełkuje. Wskazywałoby to, że miejsca największej receptywności dla pyłku są w środkowej i bazalnej części papilli, tam gdzie jej ściana jest bardziej przepuszczalna, co ma prawdopodobnie duże znaczenie dla procesów hydratacji ziaren pyłku [3, 9]. Ziarna pyłku *Brassica oleracea* są bardzo odwodnione, w chwili zetknięcia z papillami znamienia typu suchego, a mimo to, zgodne ziarna szybko zostają uwodnione [14].

W miejscu zetknięcia pyłku z papillą zachodzą reakcje, które przygotowują pyłek do kiełkowania. Zostały one dokładnie zbadane przy użyciu mikroskopu elektronowego oraz metodami cytochemicznymi. W otoczkę pyłku jest dużo enzymów, zwłaszcza lipidowych, które można usunąć z pyłku detergentami lub rozpuszczalnikami organicznymi. Kiedy ziarno pyłku osiada na receptywnym znamieniu, to po upływie 30 min. otoczka pyłku, czyli pollenkit spływa z egzyny i tworzy podstawkę. Podstawka taka trwale przytwierdza ziarno pyłku do papilli i dzięki temu nie ulega ona wypłukaniu nawet pod wpływem działania rozpuszczalników. Powstawaniu podstawki towarzyszą zmiany w protoplasście i w ścianie komórkowej papilli. W miejscu zetknięcia z pyłkiem w cytoplazmie papilli tworzy się strefa zawierająca dużą liczbę pęcherzyków, zaś struktura ściany ulega rozluźnieniu. Substancje tworzące podstawkę stają się elektronogeste. Wkrótce ziarno pyłku kiełkuje, a łagiewka wnika w miejsce podstawki w rozluźnioną, śluzowatą powierzchnię ściany komórkowej papilli i

rośnie wzdłuż papilli ku jej podstawie. Wewnętrzna warstwa ściany papilli nie zostaje przzerwana, a zatem łagiewka pozostaje między dwiema warstwami ściany komórkowej, nie wrastając do światła komórki.

Na niedojrzałych znamionach *Brassica* łagiewka może początkowo rosnać tak, że niemal przenika ścianę papilli, ale zazwyczaj wzrost jej zostaje zahamowany po zetknięciu się z plazmolemmą, wtedy łagiewka zmienia kierunek wzrostu o 180° i przyjmuje kształt litery U [14].

Przy niezgodnym zapyleniu nawet po kilku godzinach podstawka nie tworzy się, a ziarna pyłku można spłukać ze znamienia. Jeżeli pyłek zostanie uwodniony sztucznie i przeniesiony na znamię, podstawka także nie wykształca się, stąd wniosek, że do wytworzenia podstawki, której obecność jest przejawem zgodności między pyłkiem a znamieniem, konieczna jest reakcja cytochemiczna między substancjami otoczki pyłku a enzymami znamienia [14, 23, 43]. Wielu autorów postuluje wzajemne oddziaływanie enzymów takich jak peroksydazy, esterazy, kwaśna fosfataza, zlokalizowanych na powierzchni pyłku z substancjami ze znamienia [4, 11, 19].

APERTURY

W sporodermie ziarna pyłku są specjalnie przystosowane miejsca, przez które łagiewka może kiełkować (porusy). W intynie apertur niezgodnego pyłku mogą wystąpić reakcje kalozowe, podobne do reakcji w papilli. Na obwodzie apertur uwodnionego pyłku stwierdzono zwiększenie koncentracji jonów Ca^{2+} [2, 47]. Wskazuje to na znaczenie apertur jako miejsc wczesnego kontaktu między ziarnem pyłku a znamieniem [2, 14, 20, 52].

Kiedy ziarno pyłku zostanie uwodnione to jego objętość zwiększa się niekiedy dwukrotnie. Następuje otwarcie apertury na skutek oderwania się operkulum (dyskowatej sporopoleninowej zatyczki) lub przez pęknięcie cienkiej warstwy sporopoleniny. Przez otwór czyli aperturę może wykiełkować łagiewka. Podczas tego procesu zmianie ulega również struktura intyny. Najpierw ulega rozluźnieniu i pęcznieje zewnętrznie

trzna, zgrubiała warstwa celulozowa, prawdopodobnie pod wpływem enzymów wyzwalanych z warstwy środkowej intyny. Po rozluźnieniu struktury powierzchni intyny jej środkowa warstwa może uwypuklić się ponad sporodermę i utworzyć wierzchołek łagiewki. Początkowo jest on okryty ścianą zbudowaną głównie z celulozy, ale wkrótce w ścianie wierzchołka pojawia się coraz więcej białek, w tym enzymy rozluźniające strukturę celulozy. Rola tych enzymów może polegać na utrzymywaniu luźnej i elastycznej struktury ściany wierzchołka łagiewki, ale także może zmieniać strukturę ścian komórek, wzdłuż których łagiewka rośnie. Na przykład u leszczyny przez pory wydzielane są białka już podczas hydratacji ziarna pyłku, jednak ilość tych białek jest znikoma [20]. U *Clivia nobilis* po zastosowaniu metody autoradiografii stwierdzono wydzielanie przez pory białek i RNA, a w późniejszych etapach rozwoju wydzielanie tych substancji przez rosnący wierzchołek łagiewki [52].

ENZYMY CZYNNE PODCZAS KIELKOWANIA PYŁKU

O enzymach, które są wydzielane przez wierzchołek łagiewki można wnioskować na podstawie zmian zachodzących w komórkach znamienia i szyjki słupka, wzdłuż których łagiewka rośnie. Jednym z pierwszych enzymów wydzielanych przez pyłek jest prawdopodobnie kutynaaza, która aktywizuje się pod wpływem wydzielin znamienia i powoduje trawienie kutikuli. Stwierdzono także wydzielanie lub uwalnianie z powierzchni egzyny kwaśnej fosfatazy, peroksydazy i esterazy [4, 11, 14, 19, 20].

Przy zgodnym zapyleniu u *Crocus* następuje enzymatyczna „erozja” kutykuli, w wyniku współdziałania enzymów pyłku i wydzielin znamienia. Wokół wierzchołka łagiewki wykryto kwaśne hydrolazy, prawdopodobnie wydzielone przez łagiewkę, równocześnie stwierdzono, że penetracja łagiewek jest całkowicie zahamowana po uprzednim enzymatycznym rozkładzie białek wchodzących w skład wydzielin znamienia. Łagiewki pewnych przedstawicieli rodziny Cruciferae są zdolne do penetracji kutikuli na

znamieniu *Crocus* (Iridaceae). Pomimo braku pokrewieństwa tych roślin mechanizmy współdziałania enzymów ze znamieniem i pyłku są podobne [19].

Prawdopodobnie z wierzchołka łagiewki pochodzą różne enzymy, m.in. enzymy trawiące blaszki środkowe i ściany komórkowe. Wskazują na to zmiany w ścianach komórkowych tkanek znamienia i szyjki słupka po przerośnięciu wzdłuż nich łagiewek u *Gasteria*, *Hypericum* oraz paru gatunków *Arachis* [4, 7, 11, 14, 49]. Niekiedy przejściu łagiewki towarzyszą zmiany wewnątrz komórek słupka np. następuje hydroliza ziaren skrobi, degeneracja organelli lub całego protoplastu.

ROLA JONÓW WAPNIA PODCZAS KIELKOWANIA PYŁKU

U przedstawicieli 40 rodzin wykazano *in vitro*, że obecność jonów wapnia w pożywce korzystnie wpływa na zdolność kielkowania i tempo wzrostu łagiewek u przedstawicieli 40 rodzin. Prawie każda rozpuszczalna sól wapniowa daje efekt szybszego kielkowania większej liczby ziaren pyłku. Brak jonów wapnia wyraźnie ogranicza zdolność kielkowania pyłku. Pobieranie przez łagiewki jonów wapnia z wydzielin komórek znamion stwierdzono metodą autoradiografii z użyciem $^{45}\text{Ca}^{2+}$ u *Primula officinalis* i *Ruscus aculeatus* [5]. Doświadczenia *in vitro* nad kielkowaniem pyłku *Hemanthus* i *Oenothera* potwierdziły znaczenie jonów Ca^{2+} dla prawidłowego rozwoju łagiewki. Metodą autoradiografii stwierdzono pobieranie z pożywki jonów Ca^{2+} przez kielkujący pyłek w okolicach apertur i przez łagiewkę, głównie na jej wierzchołku [1, 2, 3, 5].

Dla prawidłowego kielkowania łagiewki pyłkowej ważna jest określona koncentracja jonów wapniowych, która *in vivo* zostaje osiągnięta w wyniku hydrolizy pektyn w blaszkach środkowych komórek znajdujących się pod powierzchnią znamienia. Na znamieniu wykryto podwyższoną koncentrację jonów wapnia na plazmolemie papilli i w przestworach apoplastycznych komórek pod papillami, a także w wydzie-

linie pokrywającej znamię. Koncentracja wapnia nie różniła się zasadniczo na mokrym znamieniu *Ruscus aculeatus* i na suchym *Primula officinalis* [1, 3].

W doświadczeniach prowadzonych na *Brassica* stwierdzono, że po samozapyleniu i niezgodnych zapyleniach zwiększa się koncentracja jonów wapnia w wydzielinie i w kielkujących łagiewkach pyłkowych. W łagiewkach stężenie jest wyższe niż na znamieniu i pod nim. Uznano, że na wierzchołku łagiewek otwierają się kanały wapniowe, przez które jony Ca^{2+} są raczej wydalone niż pobierane podczas kielkowania łagiewki [46, 47].

Podwyższenie koncentracji jonów Ca^{2+} w zakresie stężeń mikromolarnych zostało stwierdzone w wielu tkankach roślinnych w procesie morfogenezy i rozpoznawania się komórek, co związane jest z podwyższeniem aktywności szeregu enzymów włączonych w różne szlaki metaboliczne [25, 31]. Prawdopodobnie w niedalekiej przyszłości zostanie wyjaśniona rola jonów Ca^{2+} zarówno na znamieniu jak i w kielkującej łagiewce pyłkowej.

RÓŻNE CZYNNIKI MODYFIKUJĄCE KIELKOWANIE I WZROST ŁAGIEWKI

Reakcje pyłku na znamieniu zależą nie tylko od warunków, jakie wynikają z budowy i stanu receptywności znamienia, lecz także od cech samego pyłku i szeregu innych czynników.

CZYNNIK GENETYCZNY

Żywotność pyłku i jego zdolność do zapłodnienia jest determinowana genetycznie w sposób bardzo swoisty i indywidualny, ponieważ o cechach ziarna pyłku decyduje haploidalny genom, który może być zmodyfikowany podczas mejozy. W próbie pyłku z tej samej rośliny może wystąpić kilka typów genetycznych, przy czym ogromne znaczenie mają geny niezgodności i ich wieloalleliczność [17, 34, 35]. Natomiast geny determinujące wigor wzrostu łagiewki i jej odporność na stresy decydują także o jej szansach w doprowadzeniu do zapłodnienia, zatem mają ogromny wpływ na współzawodnictwo ła-

giewek i jakość potomstwa. Mikroskopijny gametofit męski (ziarno pyłku i łagiewka) jest o wiele prostszy w budowie od dużego, długo żyjącego sporofitu (drzewa lub rośliny zielnej). Wydaje się więc, że cechy gametofitu i sporofitu są uwarunkowane działaniem całkowicie różnych genów. Wbrew temu intuicyjnemu przypuszczeniu, bardzo liczne geny podlegające ekspresji w ziarnach pyłku są również czynne w tkankach sporofitu.

Porównano enzymy pyłku i sporofitu różnych roślin (*Zea mays*, *Populus* i *Hordeum*) i stwierdzono, że niektóre enzymy w komórkach sporofitu oraz gametofitu męskiego są identyczne. I tak tkanki korzeni, liści i nasion wykazują zawartość aż 60% takich samych enzymów jak pyłek. Należy zaznaczyć, że w ziarnach pyłku wykazano też obecność pewnych specyficznych enzymów [32, 33]. Stwierdzono również, że wskaźniki tempa wzrostu i odporność na stresy u roślin i ich pyłku są podobne [35, 42].

POZYCJA KWIATU W KWIATOSTANIE

Oprócz czynnika genetycznego, na zdolność kielkowania pyłku ma wpływ np. pozycja kwiatu, z którego pochodzi pyłek. U roślin takich jak kukurydza, ryż itp. kwiatostany są złożone z wielu kwiatów będących w różnych stadiach rozwoju, jedne wcześniej wysypują pyłek, a inne później. Stwierdzono korelację między żywotnością pyłku a pozycją kwiatu w kwiatostanie. Wykazano, że najwięcej żywotnego pyłku rozwija się w kwiatach, które otwierają się najwcześniej, podczas gdy kolejne kwiaty kwiatostanu wytwarzają coraz mniej żywotnego pyłku [40].

LICZBA ZIAREN PYŁKU NA ZNAMIENTU

Innym ważnym czynnikiem jest liczebność ziaren pyłku na znamieniu. Wiele gatunków wykazuje zaniżoną zdolność kielkowania pyłku w warunkach niedopylenia. Zapylenie małą ilością pyłku czyli niedopylenie prowadzi do tego, że każda łagiewka może dotrzeć do zalążka i nastąpi zjawisko podwójnego zapłodnienia. W warunkach eksperymentalnych ma to praktyczne znaczenie, gdy wprowadza się geny, które są po-

žadane w nowej odmianie, ale równocześnie wspomniane geny determinują powolny wzrost łagiewek. Przy swobodnej konkurencji z szybko rosnącymi łagiewkami, wspomniane, wolniej rosnące łagiewki nie miałyby szansy dotarcia jako pierwsze do zalążków. Niedopylenie pozwala zatem zwiększyć różnorodność genetyczną uzyskiwanych mieszańców w przyrodzie z reguły tego typu zjawiska nie występuje [35, 36, 38].

W warunkach naturalnych i w uprawach większość roślin jest przystosowana do przyjęcia dużej ilości pyłku. Przy uzyskiwaniu nowych odmian w hodowlach szklarniowych zaleca się kilkakrotne zapylanie w celu polepszenia wiązania mieszańcowych odmian. Korzystny wpływ nadmiaru pyłku na kiełkowanie łagiewek i ich wrastanie do zalążni stwierdzono u gruszy, jabłoni i róż [54, 55, 56].

TYP PYŁKU.

Kiełkowanie pyłku zależy także od typu pyłku – ziarna trójkomórkowe kiełkują szybciej niż pyłek dwukomórkowy. W trójkomórkowych ziarnach pyłku, są zgromadzone potrzebne zapasy RNA i białek, które wystarczają do kiełkowania i początkowego wzrostu łagiewki. Natomiast pyłek dwukomórkowy nie ma tak dużych zapasów, wobec tego pewna ilość RNA i białka musi być syntetyzowana podczas kiełkowania łagiewki. Wnioski takie nasunęły doświadczenia, w których wykazano, że kiełkujące trójkomórkowe ziarna pyłku są mniej wrażliwe na inhibitory syntezy RNA i białek w porównaniu z kiełkującymi dwukomórkowymi ziarnami [28, 32].

WARUNKI ŚRODOWISKA

Szybkość kiełkowania i wzrostu łagiewki pyłkowej zależy zarówno od gatunku lub odmiany rośliny jak i od warunków środowiska. Szczególne znaczenie odgrywa tu temperatura.

Optymalną temperaturą do kiełkowania pyłku większości roślin jest zakres od 23° do 27°C, potwierdzają to liczne doświadczenia *in vitro* i *in vivo*, np. na znamieniu *Persimmon* najszybciej kiełkują łagiewki przy 25°C. W tej temperaturze po upływie 24 godz. łagiewka przerastała szyj-

kę, a średnia szybkość wydłużania się jej wynosiła 1.0–0.6 mm/godz. [16].

Temperatura i wilgotność równocześnie modyfikują zdolność pyłku do kiełkowania. Suchy pyłek w niskiej temperaturze (ok. 4°C) można przechowywać stosunkowo długo bez utraty żywotności. Uwodnione ziarna pyłku są bardzo wrażliwe na wpływ różnorodnych czynników i łatwo tracą żywotność. Stres temperaturowy (38–45°C) i przetrzymanie pyłku w wilgotnej komorze (95% wilg.) powoduje drastyczne obniżenie żywotności pyłku, jego zdolności do kiełkowania, a także hamuje wzrost łagiewek. Każdy z wymienionych stresów stosowany oddzielnie znacznie słabiej wpływa na żywotność pyłku i wigor łagiewek [45].

Procesy zachodzące po zapyleniu są wynikiem współoddziaływania znamienia i pyłku, czyli dwóch zupełnie różnych organizmów – sporofitu i gametofitu. Oba organizmy wykształciły różne mechanizmy metaboliczne i cechy morfologiczne wzajemnie uzależnione. Złożoność procesów zachodzących w pyłku i znamieniu wynika ze wzajemnych przystosowań obu pokoleń do spełnienia funkcji rozrodczych.

LITERATURA

- [1] BEDNARSKA E. 1988. Lokalizacja wapnia w znamieniu *Ruscus aculeatus* – badania z zastosowaniem metody fluorescencyjnej (CTC), mikroanalizy rentgenowskiej oraz metody cytochemicznej (PA). IV Ogólnopolska Konferencja „Mechanizmy regulacji morfogenezy układów roślinnych”.
- [2] BEDNARSKA E. 1988. Wpływ jonów Ca^{2+} na wzrost łagiewek pyłkowych i syntezę kalozy łagiewkowej – badania z użyciem $^{45}\text{Ca}^{2+}$ oraz regulatorów wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia. IV Ogólnopolska Konferencja „Mechanizmy regulacji morfogenezy układów roślinnych”.
- [3] BEDNARSKA E. 1991. Calcium uptake from the stigma by germinating pollen in *Primula officinalis* L. and *Ruscus aculeatus* L. *Sex. Plant Reprod.* 4: 36–38.
- [4] BREDEMEIJER G. M.M. 1984. The role of peroxidases in pistil – pollen interactions.
- [5] BREWBAKER J. L., KWACK B. H. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen growth. *Am. J. Bot.* 50: 859–865.
- [6] CIAMPOLINI F., CRESTI M., KAPIL R. N. 1983. Fine structural and cytochemical characteristics of style and stigma in olive. *Caryologia* 3(36): 211–230.

- [7] CIAMPOLINI F., SHIVANNA K. R., CRESTI M. 1988. The structure and cytochemistry of the pistil of *Hypericum calycinum*: the style. *Sex. Plant Reprod.* **1**: 248–255.
- [8] CLARKE A. E., ANDERSON M. A., ATKINSON A., BACIC A., EBERT P. R., JAHNEN W., LUSH M., MAU S.-L., WOODWARD J. R. 1989. Recent developments in the molecular genetics and biology of self-incompatibility. *Plant Mol. Biol.* **23**: 267–271.
- [9] CRESTI M., CIAMPOLINI F., SANSAVINI S. 1985. Caratteristiche morfologiche dello stigma di alcune piante da frutto. *Riv. Ortoflorofrutt. It.* **69**: 49–62.
- [10] CRESTI M., CIAMPOLINI F., van WENT J. L., WILMS H. J. 1982. Ultrastructure and histochemistry of *Citrus limon* (L.) stigma. *Planta* **156**: 1–9.
- [11] DULBERGER R. 1990. Release of proteins from the pollen wall of *Linum grandiflorum*. *Sex. Plant. Repr.* **3**: 18–22.
- [12] DUMAS C., ROUGIER M., ZANDONELLA P., CIAMPOLINI F., CRESTI M., PACINI E. 1978. The secretory stigma in *Lycopersicum peruvianum* Mill.: ontogenesis and glandular activity. *Protoplasma* **96**: 173–187.
- [13] EGEA J., BURGOS L., GARCIA J. E., EGEA L. 1991. Stigma receptivity and style performance in several apricot cultivars. *J. Hort. Sci.* **66**(1): 19–25.
- [14] ELLEMAN C. J., DICKINSON H. G. 1990. The role of the exine coating in pollen – stigma interactions in *Brassica oleracea* L. *New Phytol.* **114**: 514–518.
- [15] ELLIS M. F., SEDGLEY M., GARDNER J. A. 1991. Interspecific pollen – pistil interaction in *Eucalyptus* (L.) Her. (Myrtaceae): effect of taxonomic distance. *Ann. Bot.* **68**: 185–194.
- [16] FUKUI H., DEMACHI M., YAMADA M., NAKAMURA M. 1990. Effect of temperature and cross- and self-pollination on pollen tube growth in styles of Japanese Persimmon „Nishimurawase”. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **59**(2): 275–280.
- [17] HERRERO M., DICKINSON H. G. 1980. Pollen tube growth following compatible and incompatible intraspecific pollinations in *Petunia hybrida*. *Planta* **148**: 217–221.
- [18] HESLOP-HARRISON J. S., REGER B. J. 1986. Chloride and potassium ions and turgidity in the grass stigma. *J. Plant Physiol.* **124**: 55–60.
- [19] HESLOP-HARRISON Y. 1977. The pollen-stigma interaction: pollen tube penetration in *Crocus*. *Ann. Bot.* **41**: 913–922.
- [20] HESLOP-HARRISON Y., HESLOP-HARRISON J. S., HESLOP-HARRISON J. 1986. Germination of *Corylus avellana* (hazel) pollen: hydration and the function of the oncus. *Acta Bot. Neerl.* **35**: 265–284.
- [21] HESLOP-HARRISON Y., SHIVANNA K. R. 1977. The receptive surface of the angiosperm stigma. *Ann. Bot.* **41**: 1233–1258.
- [22] HESSE M. 1988. Some parallelism in pollen wall configuration between Orchidaceae and Annonaceae. W: CRESTI M., GORI P., PACINI E. (red.), *Sexual Reproduction in Higher Plants*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo. s. 474.
- [23] HOGENBOOM N. G. 1983. Bridging a gap between related fields of research: pistil-pollen relationship and the distinction between incompatibility and incongruity. *Phytopathology* **73**. **3**: 381–383.
- [24] JACKSON J. F., LINSKENS H. F. 1990. Bioassay for incompatibility. *Sex. Plant Reprod.* **3**: 207–212.
- [25] KACPERSKA A. 1988. Rola wapnia w regulacji wzrostu i rozwoju roślin. W: *Mechanizmy regulacji morfogenezy układów roślinnych*, IV Ogólnopolska Konferencja, Rogów, 9–10 VI 1988.
- [26] KANDASAMY M. K., KRISTEN U. 1987. Developmental aspects of ultrastructure, histochemistry and receptivity of the stigma of *Nicotiana glauca*. *Ann. Bot.* **60**: 427–437.
- [27] KNOX R. B., KENRICK J., JOHNSON S., DUMAS Ch. 1989. Reproductive function in the minosoid legume *Acacia retinoides*. Ultrastructural and cytochemical characteristics of stigma receptivity. *Austr. J. Bot.* **37**(2): 103–124.
- [28] LINSKENS H. F. 1988. Present status and future prospects of sexual reproduction research in higher plants. W: CRESTI M., GORI P., PACINI E. (red.), *Sexual Reproduction in Higher Plants*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo. s. 451–457.
- [29] LU J., MAYER A., PICKERSGILL B. 1990. Stigma morphology and pollination in *Arachis* L. (Leguminosae). *Ann. Bot.* **66**: 73–82.
- [30] MACKENZIE C. J., YOO B. Y., SEABROOK J. E. A. 1990. Stigma of *Solanum tuberosum* cv. Shepody: morphology, ultrastructure and secretion. *Amer. J. Bot.* **77**(9): 1111–1124.
- [31] MANN P. L. 1988. Membrane oligosaccharides: structure and function during differentiation. *Intern. Review of Cytology* **112**: 82–83.
- [32] MASCARENHAS J. P. 1989. The male gametophyte of flowering plants. *The Plant Cell*. **1**: 657–664.
- [33] MASCARENHAS J. P. 1990. Gene activity during pollen development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**: 317–38.
- [34] MULCAHY D. L., CURTIS P. S., SNOW A. A. 1983. Pollen competition in a natural population. W: JONES C. E., LITTLE R. J. (red.), *Experimental Pollination Biology*. Sci. and Acad. 330–337.
- [35] MULCAHY D. L., MULCAHY G. B. 1987. The effects of pollen competition. *Amer. Sci.* **75**: 44–50.
- [36] NAMAI H., OHSEWA R. 1988. Possibility of expanding genetic variation by limited pollination based on the reproductive success rate of pollen grains deposited on stigma. W: M., GORI P., PACINI E. (red.), *Sexual Reproduction Higher Plants*. CRESTI Springer, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo. 63–68.
- [37] OCKENDON D. J. 1971. Pollen tube growth and the site of the incompatibility reaction in *Brassica oleracea*. *New Phytol.* **71**: 519–522.
- [38] OTTAVIANO E., SARI-GORLA M., FROVA C. 1988. Male

- gametophytic selection in higher plants. W: CRESTI M., GORI P., PACINI E. (red.), *Sexual Reproduction Higher Plants*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokio. 35–42.
- [39] OWENS S. J., McGRATH S. 1984. Self incompatibility and the pollen-stigma interaction in *Tradescantia ohiensis* Rafin. *Protoplasma* **121**: 209–213.
- [40] 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 inflorescens. *Acta Univ. Szeged. Acta Biol.* **34**(1–4): 27–34.
- [41] SCHILL R., DANNENBAUM CH., JENTZSCH E.-M. 1988. Untersuchungen an Bromeliennarten. *Beitr. Biol. Pflanz.* **63**: 221–252.
- [42] SCHWEMMLE J. 1968. Selective fertilization in *Oenothera*. *Adv. Genetics.* **14**: 225–323.
- [43] SEDGLEY M. 1975. Flavonoids in pollen and stigma of *Brassica oleracea* and their effects on pollen germination *in vitro*. *Ann. Bot.* **39**: 1091–1095.
- [44] SHIVANNA K. R., CIAMPOLINI F., CRESTI M. 1989. The structure and cytochemistry of the pistil of *Hypericum calycinum*: the stigma. *Ann. Bot.* **63**: 613–620.
- [45] SHIVANNA K. R., LINSKENS H. F., CRESTI M. 1991. Responses of tobacco pollen to high humidity and heat stress: viability and germinability *in vitro* and *in vivo*. *Sex. Plant Reprod.* **4**: 104–109.
- [46] SINGH A., PAOLILLO D. J. Jr. 1990. Role of Calcium in the callose response of self-pollinated *Brassica stigmas*. *Am. J. Bot.* **77**(1): 128–133.
- [47] SINGH A., PERDUE T. D., PAOLILLO D. J. Jr. 1989. Pollen-pistil interactions in *Brassica oleracea*: cell calcium in self and cross pollen grains. *Protoplasma* **151**: 57–61.
- [48] SLATER A. T., CALDER D. M. 1990. Fine structure of the wet, detached cell stigma of the orchid *Dendrobium speciosum* Sm. *Sex. Plant. Reprod.* **3**: 61–69.
- [49] STEER M. V., STEER J. W. 1989. Pollen tube tip growth. *New Phytol.* **23**: 323–358.
- [50] ŚNIEŻKO R., VISSER T., PIJNACKER-HORDIJK J., DUBOIS L. 1988. Wiązanie nasion i wzrost łagiewek pyłkowych po zapłodnieniu róż odm. „Sonia” pyłkiem „Red Success”. IV Konferencja Embryologów Rastlin, Zwoleń. 57–59.
- [51] ŚNIEŻKO R., WINIARCZYK K. 1991. Pollen tube growth in the pistils of some Cruciferae. *Acta Univ. N. Copernici* (w druku).
- [52] TANG PEI-HUA, ZHU YING-MIN. 1988. Nucleic acid and protein synthesis and release during development of male gametophyte (MG) of *Clivia nobilis in vitro*. W: CRESTI M., GORI P., PACINI E. (red.), *Sexual Reproduction Higher Plants*. Springer, Berlin. 485.
- [53] TIEZZI A., FOCARDI S., CIAMPOLINI F., CRESTI M. 1981. La componente lipidica dell essudato stigmatico di *Citrus limon* (L.) Burm. *Giorn. Bot. Ital.* **115**: 95–101.
- [54] VISSER T., ŚNIEŻKO R., MORCUCCI C. M. 1988. The effect of pollen load on pollen tube performance in apple, pear and rose styles. W: CRESTI M., GORI P., PACINI E. (red.), *Sexual Reproduction Higher Plants*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokio. 75–80.
- [55] VISSER T., VERHOEGH J. J. 1988. The influence of double pollination and pollen load on seed set and seedling vigour of apple and pear. W: CRESTI M., GORI P., PACINI E. (red.), *Sexual Reproduction Higher Plants*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokio. 369–374.
- [56] VRIES DE D. P., DUBOIS L. A. M. 1983. Pollen and pollination experiments, X. The effect of repeated pollination on fruit and seed set in crosses between the hybrid tea-roses cvs. Sonia and Ilona. *Euphytica* **32**: 685–689.
- [57] WET DE E., ROBERTSE P. J., COETZEE J. 1990. Ultrastructure of the stigma and style *Mangifera indica* L. *S.-Afr. Tydskr. Plantk.* **56**(2): 206–213.
- [58] WILLEMSE M. T.M., FRANSSEN-VERHEIJEN M. A.W. 1986. Stylar development in the open flower of *Gasteria verrucosa* (Mill.) H. Duval. *Acta Bot. Neerl.* **35**(3): 297–309.
- [59] WILLIAMS I. H., MARTIN A. P., FERGUSON A. W., CLARK S. J. 1990. Effect of pollination on flower, pod and seed production in white lupin (*Lupinus albus*). *J. Agric. Sci.* **115**: 67–73.