

CIAŁA UBISCHA – PRODUKT DZIAŁALNOŚCI TAPETUM

The Ubisch bodies – the product of tapetal activity

Joanna LEŚNIEWSKA

Summary. This review describes hitherto prevailing knowledge on Ubisch bodies produced by tapetal cells; process of their origin and the structure of mature forms. It also presents the hypothesis concerning the supposed functions of orbicules in the anther of *Spermatophyta*.

Key words: tapetum, ultrastructure, Ubisch bodies = orbicules, glycoalkaloid, sporopollenin

Mgr Joanna Leśniewska, Instytut Biologii, Filia Uniwersytetu Warszawskiego w Białymstoku, ul. Świerkowa 20 B, 15–950 Białystok

WSTĘP

Proces tworzenia się pyłku jest skorelowany czasowo, przestrzennie i funkcjonalnie z otaczającą go tkanką tapetalną, stanowiącą najbardziej wewnętrzną warstwę ścienną pylnika. Istnieją znaczne różnice w sposobie, zasięgu i synchronizacji tych wzajemnych relacji, zwłaszcza gdy porówna się tapetum sekrecyjne i periplazmoidalne.

Tapetum jest tkanką o charakterze wydzielniczym. Po przejściu kolejnych etapów różnicowania ostatecznie zanika ono przed antezą, a wszystkie pochodzące z niego produkty zostają wykorzystane na potrzeby rozwijającego się pyłku. Należą do nich przede wszystkim substancje odżywcze, poza tym enzymy (m.in. katalaza degradująca otoczkę tetrad), białka pełniące funkcję rozpoznawczą w procesie zapylania, substancje powlekające i sklejające dojrzały pyłek oraz materiały niezbędne do budowy egzyny w formie prekursorów sporopolleniny; u wielu roślin tapetum wytwarza też ciała Ubischa [1, 2, 10, 16, 18, 31, 32].

Ciała Ubischa to drobne sporopolleninowe

struktury, pojawiające się masowo w komorze pyłkowej wkrótce po rozpadzie tetrad. W tym samym czasie uwolnione mikrospory rozbudowują swoje zewnętrzne, egzynowe ściany z identycznego pod względem chemicznym materiału, stąd upowszechnił się pogląd o roli ciał Ubischa w tworzeniu ścian pyłku.

Dotychczasowe badania, oparte głównie na obserwacjach morfologicznych i cytochemicznych, starały się wyjaśnić sposób powstawania ciał Ubischa w tapetum, ich ontogenezę oraz budowę wewnętrzną; były też okazją do postawienia kilku hipotez dotyczących funkcji orbikul w pylniku. O tym, czy istnieją na ich poparcie przekonujące dowody, oraz co do tej pory wiadomo o ciałach Ubischa traktuje niniejszy artykuł.

POWSTAWANIE I BUDOWA CIAŁ UBISCHA

Występowanie ciał Ubischa było dotychczas uznawane za wyłączną cechę pylników roślin okrytonasiennych z tapetum sekrecyjnym [31]. Jednak podobne ciała zaobserwowano także

u pewnych nagozależkowych [40], oraz u paproci [Lugardon 1981 – cyt. za 32]. U mszaków nie były one dotąd stwierdzane, lecz ostatnio analogiczne utwory znaleziono u mchu *Ceratodon purpureus* [48].

Pierwsze wzmianki o tych strukturach obserwowanych w mikroskopie świetlnym pojawiły się w pracach cytologów w XIX w. [Rosanof 1865 – cyt. za 13]. Opisano je dokładniej w latach dwudziestych naszego stulecia [Schnarf 1923, Krjatchenko 1925, Ubisch 1927, Kosmath 1927, Py 1932 – cyt. za 17], ale dopiero użycie mikroskopu elektronowego pozwoliło na szczegółowe poznanie ich budowy.

Ciała te przybierają przeważnie postać kulistą, bywają też płytkowate lub miseczkowate. Wymiary pojedynczych struktur mieszczą się w granicach od ok. 0,2 μm (niektóre nawet poniżej zdolności rozdzielczej mikroskopu świetlnego) do ok. 1 μm [32], ale zdarzają się też większe [36]. Czasem mogą zlewać się w agregaty [9, 21].

W literaturze mają wiele określeń, ale najczęściej używane są dwa: „ciała Ubischa” [Kosmath 1927 – cyt. za 40] i „orbikule” [Erdtman i in. 1961 – cyt. za 40]. Termin „ciała Ubischa” pochodzi od nazwiska badacza, który wniósł duży wkład w ustalenie ich natury i występowania, chociaż sam nie był ich odkrywca.

Tworzenie się pro-orbikul

Formę wyjściową dla ciał Ubischa stanowią tzw. pro-ciała Ubischa (pro-orbikule) – powstające w komórkach tapetum zazwyczaj podczas trwania mejozy w mikrosporocytach.

Dane dotyczące dokładnego czasu i miejsca pojawiania się pro-ciał oraz typu organelli związanych z ich zapoczątkowaniem różnią się u badanych gatunków. U *Helleborus foetidus* [9], już w stadium tkanki sporogennej, obserwowano w cytoplazmie tapetum ograniczone błoną ciała o średniej elektronowej gęstości (ang. grey bodies), przypominające sferosomy. W stadium mikrospor otaczały je rybosomy, później ich zawartość łączyła się bezpośrednio z cysternami ER (retikulum endoplazmatyczne), co sugerowało udział obu typów organelli w formowaniu materiału pro-ciał. U *Lilium* [17] uznano je tak-

że za struktury podobne do sferosomów, ale były pozbawione błon. Występowały w tapetum w fazie tetrad i nie obserwowano ich związku z ER czy rybosomami, chociaż sami autorzy nie wykluczali, że mogli nie uchwycić tego stadium. Na bliski związek z ER zwracano uwagę u *Sorghum bicolor*, ale dopiero w trakcie opuszczania tapetum przez pro-orbikule [3]. U *Rhizogonum trichotomum* (Bignoniaceae) lipidowe pęcherzyki tworzyły się także w pobliżu RER (szorstkie retikulum endoplazmatyczne), a dopiero później były otaczane przez rybosomy [38]. Pro-ciała Ubischa *Pinus sylvestris* powstawały tuż pod błoną plazmatyczną tapetum w otoczeniu cystern ER [40]. Pro-orbikule *Allium* [37] w postaci elektronowogęstych ciał znajdowano przy plazmalemmie, a także w poszerzonych kanałach ER przecinających cytoplazmę oraz pomiędzy błonami otoczki jądrowej.

Istnieją też doniesienia o tworzeniu się pro-orbikul poza komórką tapetum. U *Citrus lemon* [23] na terenie cytoplazmy tapetum występowały co prawda liczne pęcherzyki diktiosomalne (czy ER?) o podobnej do pro-orbikul średnicy, ale dopiero po połączeniu się z błoną komórkową przypominały one pro-orbikule oraz prawdopodobnie zawierały prekursorów sporopolleniny. Podobnie Steer [43] nie stwierdził w tapetum u *Avena* żadnych pro-ciał, ani też organelli specyficznie związanych z plazmalemmą, chociaż obserwował w jej pobliżu obfite ER. Błona ta od strony mejocytów tworzyła kubkowate zagłębienia, które po zakończeniu mejozy wypełniały się kroplami lipidowymi, a ich średnica stopniowo rosła do rozmiarów rdzenia dojrzałej orbikuli. W obu przypadkach pro-orbikule tworzyły się więc wyłącznie na specjalnie zmodyfikowanej, zewnętrznej powierzchni błony plazmatycznej tapetum.

Kontrowersyjne wnioski dotyczące źródła prekursorów pro-orbikul u *Lycopersicon* wyciągnęli Polowick i Sawhney [34]. Zdaniem tych autorów, obecne w wakuolach tapetum podczas profazy mejotycznej kuliste inkluzje z wyraźnym, gęstszym rdzeniem, stopniowo zmniejszające swoje rozmiary w czasie pojawiania się orbikul w komorze pyłkowej, mogą stanowić rezerwuuar prekursorów przed ich przenie-

sieniem poza komórkę. Nie obserwowano tu zbliżania się materiału ku powierzchni, więc nie wykluczono możliwości istnienia rozpuszczalnych związków przejściowych.

W wielu pracach brak informacji o miejscu i sposobie inicjacji pro-orbikul, panują jednak zgodne opinie co do ich lipidowej natury.

UWALNIANIE PRO-ORBIKUL Z CYTOPLAZMY TAPETUM

Pod koniec mejozy (stadium tetrad) pro-ciała Ubischa opuszczają tapetum, pojawiając się w przestrzeni pomiędzy plazmalemą a ulegającą wówczas rozpuszczaniu ścianą komórkową, gdzie przekształcają się w orbikule. Najliczniej gromadzą się przy ścianie graniczącej z loculus, często w przestrzeniach radialnych między komórkami tapetum, a sporadycznie w sąsiedztwie warstwy pośredniej [21, 31, 34]. Po hydrolizie ścian tapetum utrzymują się w pobliżu jego protoplastów. Uwalnianie pro-orbikul może zachodzić jednorazowo [43], bądź kilkakrotnie, w dłuższych okresach czasu [9, 22, 40].

Sam proces przemieszczania się pro-orbikul poza tapetum nie został dotąd w pełni wyjaśniony. U *Helleborus* [9] nie zauważono rozrywania się plazmalemmy, więc przyjęto, że błona otaczająca pro-orbikule jest do niej włączana, a pro-ciała zostają pozbawione strukturalnej granicy. Inaczej interpretowano ten moment u *Lilium* [17], gdzie pro-ciała powstające w cytoplazmie nie posiadały błony. Na kilku skrawkach zauważono trwałą „nóżkę” (ang. stalk), łączącą niektóre orbikule z powierzchnią tapetum. Powstawałaby ona w sytuacji, gdy plazmalemma nie uległa rozerwaniu i pro-ciało utknęło w wy pukleniu cytoplazmy. Sugerowałoby to istnienie błon, będących fragmentem plazmalemmy, wokół usuniętych poza komórkę pro-ciał, ale u *Lilium*, [17], jak i u *Helleborus* [9] ich nie stwierdzono. Przypuszczano, że u lilii błona mogła być zsunięta z części dystalnej na wpół uwolnionej pro-orbikuli, która tylko tam pokrywała się warstwą sporopolleniny w formie czapeczki.

Brak błony wokół wolnych pro-ciał mógł być spowodowany warunkami utrwalania, gdyż badania ostatnich lat zdecydowanie wskazują na

istnienie takiej membrany plazmatycznej z glikokaliksem, obecnym również na powierzchniowej błonie tapetalnej [7, 39, 40]. Glikokaliks tworzą rozmaite polisacharydy w kompleksach z białkami, a można go uwidocznić w TEM (transmisyjnym mikroskopie elektronowym) przeprowadzając reakcję cytochemiczną m.in. z czerwienią rutenową, czy PTA (kwas fosforowo-wolframowy) w kwasie chromowym [7,40]. Glikokaliks określono jako miejsce uporządkowanej polimeryzacji sporopolleniny [Dickinson 1976 – cyt. za 1].

Rowley i Walles [40] opisali dokładnie proces uwalniania pro-orbikul z tapetum u *Pinus sylvestris*. Wynurzająca się globula, utworzona tuż pod błoną tapetalną z glikokaliksem, zostaje wprawiona w ruch obrotowy. Pewien sektor pro-orbikuli, wyciągnięty w „dziobek” i działający jak zawias, ułatwia jej wytoczenie się z krypty na powierzchni komórki. W tym czasie dolna część pro-ciała zostaje pokryta błoną z glikokaliksem. Uwolnioną globulę otacza membrana pozbawiona glikokaliksu tylko na niewielkim obszarze, stykającym się do ostatniej chwili z komórką tapetum.

PRZEKSZTAŁCANIE PRO-ORBIKUL W ORBIKULE

Lipidowe pro-orbikule po opuszczeniu cytoplazmy tapetum są otaczane materiałem sporopolleninopodobnym ulegając transformacji w orbikule. Równocześnie podobny materiał osadza się na powierzchni mikrospor uwalnianych z tetrad po rozpadzie kalozy [10, 11, 17]. Deponowanie sporopolleniny wydaje się zachodzić po obu stronach elektronowoprzezroczystej warstwy o grubości błony elementarnej [11].

Heslop-Harrison i Dickinson [17] określili warunki syntezy sporopolleniny w pylniku: a) jest ona formowana wyłącznie poza komórką, na zewnętrznej powierzchni plazmalemmy, b) może być deponowana na powierzchni pro-orbikul lub na specjalnej lamelli wokół pro-orbikul i egzyny, c) prekursorzy sporopolleniny muszą być obecne w soku pylnikowym oraz w przestrzeni między kalozą a sporą, d) raz spolimerizowana sporopollenina nie ulega degradacji. Autorzy sugerowali, że odkładanie nowych pokładów sporopolleniny na już istniejących (na-

rastanie orbikul i egzyny) nie jest zależne od nowo powstających błon; byłyby one tylko miejscem inicjującym syntezę sporopolleniny aż do czasu wyczerpania substratów.

Trudne do wyjaśnienia są w tej sytuacji obserwacje poczynione u *Allium* [37], gdzie w rozszerzonych kanałach ER biegnących w kierunku loculus znajdowano zarówno formy młodociane, jak i (bliżej komory pyłkowej), w pełni dojrzałe, pokryte sporopolleniną ciała Ubischa. Steer [43] sądzi, że wzięto tu błędnie przestrzenie radialne za kanały retikulum.

U pewnych roślin sporopollenina nie odkłada się od razu wokół całego pro-ciała, lecz, jak np. u *Sorghum* [3], tworzy początkowo oddzielne grudki, które z czasem zlewają się w kompletną powłokę wokół rdzenia. Podobnie jest u *Avena* [43].

Pro-ciała uwalniane w dużych ilościach tworzą agregaty, często otaczane wspólną warstwą sporopolleniny [9, 10, 21].

U gatunków należących do *Spermatophyta* znajdowany jest zwykle jeden typ orbikul, ale czasem są dwa np. u *Euphorbia palustris*, *Delonix elata* (*Fabaceae*) [21], *Lilium* [36]. Reprezentują one różne generacje ciał Ubischa, których powstawanie wiąże się ze zmieniającą się ekspresją genów w kolejnych stadiach mikrosporogenezy [21]. Te dwa rodzaje orbikul u *Euphorbia palustris* wyraźnie się różnią. Powstające wcześniej (typ A), mają centralny rdzeń, przecinający korę kanał i większe rozmiary. Często łączą się w nieregularne kompleksy przypominające swoją budową tectum, ale nie stykają się z ektegzyną. Kompleksy te nie są zorientowane przypadkowo, lecz ustawione gładką, wypukłą stroną w kierunku równie gładkich ścian ziaren pyłku. Orbikule typu B nie posiadają rdzenia, są drobne i występują pojedynczo, bądź zlewają się tworząc ścianę orbikularną.

Ciała Ubischa większości roślin przybierają kształt sferyczny, lecz np. u *Ipomoea rubro-coerulea* poza typowymi orbikulami obserwowano też duże gwiaździste struktury [46].

Orbikule *Lilium* oglądane w mikroskopie skaningowym są kuliste, lecz mają na powierzchni liczne wybrzuszenia, co upodabnia je do owocu jeżyny [35].

Uderzające jest wyraźne podobieństwo urzębienia i struktury części korowej orbikul i egzyny ziaren pyłku. U *Poa* powierzchnia obu elementów zawiera kolce, u *Cryptomeria* – pęcherzyki, a u *Degeneria* pozostaje gładka [Rowley i in. 1959 – cyt. za 13]. U pewnych gatunków roślin ścianę ciał Ubischa i egzynę przecinają mikrokanały [3]. Utworzone ze sporopolleniny egzyna i ściana orbikul są acetolizooporne [10]. Wykazują też podobną fluorescencję wywołaną primuliną [46]. Cechy te wskazują, że gametofitowy system kontrolujący tworzenie egzyny musi być zgodny ze sporofitową kontrolą genetyczną powstawania ściany ciał Ubischa [13]. Identyczną formę ściany orbikul i egzyny ziaren pyłku determinuje według Rowleya i Skvarli [39] kompleks: plazmalemma-glikokaliks.

Orbikule okrytonasiennych przechodzą w loculus sukcesywne zmiany. Reznickova i Willemse [36] opisali ich ontogenezę u *Lilium*. Pro-orbikule były początkowo pokrywane luźnym, fibrylarnym, elektronowogęstym materiałem barwiącym się pozytywnie na polisacharydy, podobnie jak osady w zagłębieniach błony plazmatycznej tapetum. Polisacharydy prawdopodobnie pochodziły z tapetalnych pęcherzyków dikiosomalnych. Włóknisty materiał otaczający rdzeń orbikuli stawał się z czasem bardziej elektronowogęsty i homogenny. Materiał odkładany wcześniej na pro-orbikulach może stanowić prekursorzy sporopolleniny lub protosporopolleninę, która po wzbogaceniu w karotenoidy przechodzi w sporopolleninę, co zmienia strukturę części korowej [Gabara 1976 – cyt. za 13]. Dokładniejsze badania ultrastrukturalne i cytochemiczne prowadzone ostatnio nad orbikulami u *Lilium* [5, 6, 7, 8], pozwoliły w nich wyróżnić 4 koncentryczne strefy:

1. Rdzeń orbikuli (ang. orbicular core), złożony głównie z nienasyconych lipidów, zawiera też proteiny (łatwo usuwane enzymatycznie), kwaśne polisacharydy i związki fenolowe [5, 6]. Enzymy włączone w biosyntezę sporopolleniny wokół pro-orbikuli mogłyby być syntetyzowane w cytoplazmie tapetum i magazynowane w pro-orbikuli, ulegając aktywacji po jej wyciśnięciu do loculus [6]. Rdzeń orbikuli jest odpowiednikiem pro-ciała powstającego w tapetum.

2. Przestrzeń pomiędzy rdzeniem a ścianą (ang. orbicular core-wall interface) ma średnicę ok 10 nm, barwi się pozytywnie KMnO₄, zawiera nienasycone lipidy i białka, a brak w niej obojętnych polisacharydów – wszystkie te cechy odpowiadają błonie biologicznej. Zawiera ona także zestryfikowane pektyny i polifenole. Pokryta jest glikokaliksem. Obecnie utrzymuje się, że enzymatyczny system biorący udział w biosyntezie sporopolleniny znajduje się w tej błonowej strukturze [6, 7]. Zarówno rdzeń, jak i otaczająca go błona są wrażliwe na acetolizę, więc nie zawierają sporopolleniny.

3. Ściana orbikuli (ang. orbicular wall) pozostaje homogenna w TEM, wykazuje dwójłomność w świetle spolaryzowanym, co świadczy o jej regularnej przestrzennej organizacji; jest oporna na acetolizę, ale wrażliwa na utleniające działanie KMnO₄ [6]. Clement i Audran [8] przedstawiają w swojej pracy model budowy ściany orbikuli: tworzy ją trójwymiarowy, wieloboczny, szkielet konstrukcyjny (glikokaliks), na którym deponowane są związki lipidów i polifenoli formujących wielkocząsteczkowy kompleks zwany sporopolleniną. Sporopollenina jest wysoce opornym biopolimerem. Przypuszcza się, że jest zbudowana z długołańcuchowych składników alifatycznych z różną ilością fenolowych komponentów. Jej biosynteza nie jest jeszcze całkowicie poznana. Badania przy użyciu znakowanej ¹⁴C fenyloalaniny wykazały, że składnik ten jest włączany do sporopolleniny niezależnie od stanu rozwojowego pylnika [15].

Zauważono, że grubość ściany orbikuli początkowo wzrasta, potem maleje; to samo dotyczy egzyny [36]. Przypuszczalnie sporopollenina syntetyzowana początkowo na pro-orbikulach i mikrosporach ulega podczas dojrzewania (postępującego odśrodkowo) kondensacji, co powoduje redukcję jej wymiarów [Claugher i Rowley 1987 – cyt. za 6].

4. Zewnętrzna powłoka orbikuli (ang. orbicular peripheral sheet) jest zorganizowana w postaci wielobocznej sieci pokrywającej całą powierzchnię ściany. Ma grubość około 10 nm, jest elektronowogęsta i ciągła, stanowi pozostałość glikokaliksu podtrzymywanego przez błonę otaczającą rdzeń ciała Ubischa. Glikokaliks

tworzą filamenty glikoproteinowe (kwaśne polisacharydy i proteiny), wydłużające się podczas rozwoju ściany orbikuli. Zewnętrzna powłoka orbikuli zawiera wszystkie związki, które wykrywa się w ścianie orbikuli z wyjątkiem pektyn. Białka występujące w tej strefie nie podlegają trawieniu enzymatycznemu, co może wskazywać na ich mocne osadzenie w ścianie. Wyniki badań określają zewnętrzną powłokę orbikuli jako specjalną strefę biosyntezy sporopolleniny, lecz nie pozwalają uznać jej za błonę [6].

Analogiczną błonową strukturę znaleziono na powierzchni egzyny pyłku u *Apium* [47] i u *Brassica* [14].

Orbikule powstają zawsze blisko powierzchni tapetum; nie obserwuje się ich wewnątrz loculus [11], ale zdarzają się wyjątki. U *Nymphaea colorata* [41] tkwią głęboko w komorze pyłkowej, gdzie otaczają komórki nietypowego tapetum cykliczno-inwazyjnego, tworzącego krótkotrwałe mosty w poprzek loculus. Orbikule u oliwki [30] wydają się powstawać z dala od tapetum. Są pozbawione pro-orbikularnego rdzenia. Brak go również w orbikulach u pomidora [34].

U *Ulex* opisano makro-orbikule o średnicy 2–4 μm. Występują wyłącznie przy ścianach radialnych tapetum, a otaczająca je błona jest ciągła z plazmalemą. Prawdopodobnie są tworem pozakomórkowym, o trudnej do ustalenia funkcji [27].

Ciała Ubischa u *Pinus sylvestris* powstają wielokrotnie; ich ściany są urzeźbione tak, jak istniejąca wtedy egzyna i pozostają bez zmian aż do czasu wysypywania się pyłku. Raz ukształtowane nie ulegają modyfikacjom w przeciwieństwie do orbikul u okrytonasiennych [40].

Zarówno egzyna, jak i orbikule utrwalane tradycyjnie wyglądają jednorodnie w TEM i nie wykazują istnienia struktur jednostkowych. Pewne obserwacje sugerują, że egzyna nie jest jednolita, lecz złożona z jednostek i podjednostek [Rowley 1981, Rowley i in. 1981, Rowley i Dahl 1982 cyt. za 20]. Na ich istnienie może wskazywać wygląd zewnętrznego regionu zarówno egzyny pyłku, jak i orbikul u *Calluna vulgaris* [20].

Występują tu identyczne, półkuliste wypukłości o średnicy 70–80 nm, które zinterpre-

towano jako „jednostki” sporopolleniny. Ich obecność świadczy nie tylko o ścisłym strukturalnym związku pomiędzy egzyną i orbikulami, ale też o niehomogenności sporopolleniny. Hesse [20] wykazał tu po raz pierwszy istnienie jednostek sporopolleniny bez jej uprzedniej chemicznej degradacji.

Nowa technika „freeze-substitution” okazała się cennym uzupełnieniem konwencjonalnych chemicznych metod utrwalania, gdyż umożliwia ona zachowanie labilnych makromolekuł i składników komórki. W badanych tym sposobem pylnikach *Ledebouria socialis* (Liliaceae) [19] stwierdzono, że we wczesnym etapie powstawania, zewnętrzne warstwy ściany sporopolleninowej (segzyny) oraz homologiczne produkty tapetum, czyli otoczki ciał Ubischa, składają się z wysoce regularnych podjednostek. Tworzą je skupione w grona globule o stałej średnicy ok. 28 nm, pojawiające się w elektrownogęstym materiale. Groniaste struktury widoczne są tylko przed zanikiem kalozy, później nie można ich wyróżnić. Proces tworzenia podjednostek określono tutaj próbnie jako polimeryzację sporopolleniny. Wykazano, że nie jest on bezwzględnie zależny od enzymów zlokalizowanych w błonach. Świadczą o tym grona globul znajdujące w loculus wypełnionym polisacharydowym sokiem pylnikowym, z dala od powierzchni tapetum czy tetrad.

W badaniach nad powstawaniem ciał Ubischa i rolą tapetum w budowie egzyny pyłku wykorzystuje się także metody biologii molekularnej. U *Sinapis alba* [42] wykazano w pylniku ekspresję pewnych genów kodujących białka specyficzne tylko dla tapetum, których wykrywalność ograniczała się do krótkiego okresu: od fazy tetrad do wczesnego stadium wakuolizacji mikrospor. Białka te lokalizowane są początkowo na błonie peritapetalnej i wokół pro-ciał Ubischa, a po rozpuszczeniu kalozy – na egzynie mikrospor. Wszystkie te struktury pokryte są prekursorami sporopolleniny, więc można sądzić, że wykryte białka uczestniczą w tworzeniu, bądź deponowaniu, sporopolleniny powstającej wyłącznie z tapetalnych prekursorów. Badania te pierwszy raz udowodniły, że białka syntetyzowane w tapetum są jeszcze przed je-

go rozpadem przenoszone na powierzchnię mikrospor.

ROLA CIAŁ UBISCHA

Od dawna próbowano powiązać obecność ciał Ubischa w pylniku z określoną funkcją. Szczególną uwagę zwracano zwłaszcza na możliwość ich udziału w rozbudowie ściany pyłku. Do czasu istnienia kalozy wokół tetrad izolowane mikrospory odkładają zaczątki ściany sporopolleninowej w oparciu o prekursory zawarte we własnej cytoplazmie. W przypadku *Tradescantia bracteata* [26] egzyna zostaje w tym czasie całkowicie uformowana, wykluczono więc zupełnie udział tapetum w jej powstaniu.

Jednak u większości roślin rozbudowa ściany pyłku ma miejsce dopiero po rozpuszczeniu kalozy, kiedy w komorze pyłkowej pojawiają się liczne orbikule. Zaobserwowano, że egzyna najwcześniej rozbudowuje się od strony zwróconej do tapetum pokrytego orbikulami [Heslop-Harrison 1962, Rowley 1963 – cyt. za 37]. Wysunięto hipotezę, że orbikule mogą transportować w kierunku ściany pyłku spolimeryzowaną sporopolleninę (co wielu badaczy uznało za mało prawdopodobne), bądź tylko jej prekursory [11].

Pewne obserwacje morfologiczne zdawały się wskazywać, że ciała Ubischa mogą stanowić integralny składnik egzyny. U *Allium* [37] orbikule wbudowywały się do niej w całości, o czym świadczyła wyraźna ciągłość między tymi elementami. U *Rhizogonum* [38] jedynie ich zewnętrzna, sporopolleninowa ściana była włączana do egzyny, podczas gdy lipidowe rdzenie mogły, zdaniem autora, wchodzić w skład lepkiego kitu pyłkowego powstającego z rozpadu tapetum i powlekającego dojrzały pyłek jeszcze przed jego wysypianiem się z pylnika.

Heslop-Harrison i Dickinson [17] odrzucili hipotezę o przenoszeniu gotowej sporopolleniny, uznając ją za produkt końcowy metabolizmu tapetum, który nie może być powtórnie wykorzystany.

Banerjee i Barghoorn [1971 – cyt. za 1] wskazywali, że świeżo odłożona sporopollenina nie jest trwała, lecz dopiero z czasem nabywa ta-

kich właściwości. Badacze obserwowali ciągłe, sporopolleninowe pasma łączące kolce ziaren pyłku z ciałami Ubischa, które prawdopodobnie dokonywały przenoszenia materiałów z tapetum do egzyny.

Badania na mutantach męskosterylnych linii jęczmienia [Ahokas 1975 – cyt. za 1] wykazały obecność pewnych esteraz, związanych z degradacją sporopolleniny wokół porusa ziarna pyłku. Nie wykluczone, że w przyszłości może zostać odkryty prawidłowy mechanizm degradacji sporopolleniny pochodzącej z tapetum, a uwalnianej w komorze pyłkowej. Brak ciał Ubischa w periplazmodium może świadczyć o istnieniu kilku systemów użytkowania prekursorów sporopolleniny podczas formowania ściany pyłku.

Obecnie wysuwa się pogląd, że niedorozwój egzyny w pylnikach wielu roślin męskosterylnych CMS (cytoplazmatyczna męska sterylność) jest spowodowany brakiem wytwarzania ciał Ubischa przez niewłaściwie funkcjonujące tapetum [24 i literatura tamże].

Wcześniej istniały też koncepcje, uznające orbikule za zbędny, uboczny produkt rozwoju ściany [Dickinson 1971 – cyt. za 13], czy skutek nadprodukcji sporopolleniny [Rowley 1963 – cyt. za 13].

Rozważano także ich obecność jako relikty filogenetycznego związku, łączącego tapetum z tkanką sporogenną [3].

Uznawano nawet, że można by je traktować jak pojedyncze cząstki sporopolleniny uwalniane do komory pyłkowej pylnika w wyniku autolizy komórek tapetum. Cząstki te, same odporne na autolizę, mogłyby zachowywać ograniczoną zdolność do syntezy (polimeryzacja prekursorów sporopolleniny), a ich obecność nie byłaby związana z jakąkolwiek funkcją, lecz przedstawiałaby jedną z wielu możliwości syntezy pylnika [11].

Hesse [21] nie traktuje orbikul jak rezerwuaru sporopolleniny, środka transportu, czy nadmiaru tej substancji w pylniku. Ogromne podobieństwo ich struktury, rzeźby, kształtu i średnicy do zewnętrznej części egzyny (ektegzyny) wskazuje, według autora, jedynie na homologię sporopolleninowych elementów wytwarzanych u *Spermatophyta* przez tapetum i mikrospory.

Postulat o niezbędnym udziale orbikul w budowie egzyny wydaje się też o tyle nie satysfakcjonujący, że orbikule nie zawsze występują nawet w tapetum sekrecyjnym. Brak ich np. u *Brassica oleracea* [28] i u *Arabidopsis thaliana* [29], co zdaniem niektórych autorów [29] może być powszechną cechą u przedstawicieli *Brassicaceae*.

Wskazywano też na inną funkcję orbikul w pylniku. Dickinson i Bell [1972 – cyt. za 1] sugerowali, że ciała Ubischa u *Pinus banksiana* mogą stanowić półprodukt (ang. by-product) tapetum, konieczny do utworzenia obecnej u tego gatunku błony peritapetalnej. Stanowi ją oporna na acetolizę warstwa odkładana przez tapetum także w pylnikach innych roślin. Wyścielająca komorę pyłkową, np. u *Gramineae*, jest określaną w literaturze angielskim terminem „tapetal membrane” [1] (błona tapetalna), „tapetal wall” [2] (ściana tapetalna), „czy orbicular wall” [3] (ściana orbikularna). Leżąca w sąsiedztwie warstwy pośredniej (niektóre *Compositae*) tworzy rodzaj worka (ang. culture sac), zamykającego w swoim wnętrzu rozwijające się ziarna pyłku wraz z tapetum i jest wtedy zwana ścianą czy błoną peritapetalną (ang. peritapetal = extratapetal wall, peritapetal membrane) [1]. Badacze używają tu często zamiennie terminów „błona” i „ściana”, mimo krytycznych uwag Echlin’a [10] co do słowa „błona”, gdyż chodzi tu o warstwę zawierającą sporopolleninę, a nie o labilną błonę komórkową.

Taka ściana tapetalna u *Sorghum bicolor* [3] jest opisywana jako trójwarstwowa; jej zewnętrzny, wyścielający loculus pokład stanowią orbikule, połączone sporopolleninową siecią (reticulum), poniżej której odkłada się fibrylarny materiał. Jednak nie u wszystkich roślin orbikule wchodzą w skład takiej sporopolleninowej warstwy.

Ściana tapetalna nie stanowi przeszkody dla przejścia kitu pyłkowego [36] i utrzymuje się bez większych zmian aż do antezy [2, 3, 36], kiedy rozrywana jest mechanicznie podczas pęknięcia pylnika, a nie trawiona enzymatycznie [10].

Obserwacje ścian pylnika podczas wysypywania się pyłku nasuwały przypuszczenia, że

zadaniem orbikul może być tworzenie niezwilżalnej powierzchni dyspersyjnej dla dojrzałego pyłku [11, 17]. Kurczące się przy wysychaniu ściany pylnika u *Sorghum* [3], zostają przykryte prawie całkowicie przez zbliżające się do siebie orbikule. Utworzona w ten sposób powłoka ma właściwości hydro- i lipofobowe [17], a pyłek, nawet oblepiony kitem pyłkowym, z łatwością się od niej odrywa.

Hipotezę o roli orbikul w wysypywaniu pyłku wydają się potwierdzać eksperymenty przeprowadzone przez Keijzer'a [25] u *Lilium*. Usuwał on z pękniętych pylników ścianę tapetalną wraz z orbikulami i ponownie umieszczał wewnątrz mieszaninę pyłku z kitem pyłkowym. W warunkach względnej wilgotności powietrza wynoszącej 98% prawie cały pyłek wypadł, podczas gdy w pylniku kontrolnym (nie uszkodzonym, z zachowaną ścianą tapetalną) pozostawał na miejscu. W optymalnych warunkach pyłek wysypuje się z suchych pylników.

Pacini i Franchi [33] zwracają uwagę na fakt, że sporopolleninowe powierzchnie egzyny i orbikul mają ten sam ładunek elektryczny, co prowadzi do wzajemnego odpychania się i wzmaga wyrzucanie pyłku. Odnosi się to głównie do roślin wiatropylnych z orbikulami w pylniku, takimi jak: *Gymnospermae*, *Urticaceae*, *Poaceae* oraz do pewnych *Pteridophyta*.

Zupełny brak ciał Ubischa stwierdza się u pewnych roślin z tapetum sekrecyjnym, mających silny syndrom owadopylności, takich jak *Cucurbita pepo* [4] czy storczyki (Fitzgerald i in. 1993 – cyt. za 33). Równoczesne występowanie orbikul i kitu pyłkowego może być związane z brakiem specjalizacji w sposobie zapylania, co ma miejsce u *Apiaceae*, *Oleaceae*, *Rosaceae*, *Rutaceae* [33].

Pacini [32] sądzi, że istnieje istotna różnica między tapetum ameboidalnym okrytonasiennych i paprotników, skoro znaleziono u paproci [Lugardon 1981 – cyt. 32] ciała analogiczne do orbikul.

Występowanie orbikul uznaje się za cechę odróżniającą tapetum sekrecyjne od periplazmodium, ale pojawiają się wzmianki o podobnych formach także w tapetum plazmodialnym u okrytonasiennych. Stwierdzono je u *Gentiana*

acaulis [Lombardo i Carraro 1976 – cyt. za 12], *Tradescantia virginiana* [45] i u *Butomus umbellatus* [12]. W tym ostatnim przypadku ciała sporopolleninowe powstawały w cytoplazmie tapetum na obszarze RER, początkowo jako pęcherzyki z ciemną otoczką, która z czasem zanikała. W stadium mikrospor ciała takie, bez jaśniejszego rdzenia charakterystycznego dla orbikul, były obecne zarówno w tapetum, jak i na terenie cytoplazmy mikrospor. Wyglądały podobnie jak powstająca wówczas egzyna i były na niej osadzone, ale nie analizowano w jaki sposób opuszczały cytoplazmę tapetum. Określono je jako sporopollenino-podobne do czasu przeprowadzenia szczegółowych badań cytochemicznych. Występowanie tych ciał wewnątrz plazmodium *Butomus* można interpretować jako adaptację tapetum do zredukowanej przestrzeni loculus. Mniejsze rozmiary ciał sporopolleninowych w plazmodium w porównaniu z analogicznymi w tapetum parietalnym mogą wskazywać, że efektywność mechanizmu transportu limitują rozmiary takich ciał [45]. Fernando i Cass [12] zastanawiają się, czy w wyniku redukcji przestrzeni loculus podczas ewolucji tapetum z typu parietalnego do periplazmodium, ciała sporopolleninowe nie mogły pojawić się wewnątrz komórek. Gruntowniejsze badania nad prymitywnymi jednoliściennymi mogłyby ustalić, czy obecność ciał sporopolleninowych w cytoplazmie tapetum reprezentuje cechę typową, czy też jest to sytuacja wyjątkowa.

Godny uwagi jest fakt, że u *Canna* [44], z inwazyjnym, ale nie-syncytialnym tapetum, gdzie zwykle orbikule nie powstają, długotrwałe traktowanie kolchicyną prowadziło do tworzenia się ziarnistych osadów w przestrzeniach komory pyłkowej. Wyglądem przypominały orbikule, charakterystyczne dla tapetum sekrecyjnego: miały centralny, przezroczysty rdzeń otoczony elektronowogęstą powłoką, występowały pojedynczo, czasem w agregatach. Identyczne granule stwierdzono też w większych pęcherzykach diktiosomalnych i wakuolach. Ta eksperymentalna indukcja może oznaczać, że tapetum posiada potencjalną zdolność do produkcji sporopolleniny, jeśli nawet normalnie nie wykazuje oznak takiej aktywności.

Ostateczne rozstrzygnięcia, dotyczące powstawania ciał Ubischa, ich struktury, czy mechanizmu funkcjonowania, zapadną prawdopodobnie w ciągu najbliższych lat dzięki zastosowaniu nowych technik badawczych, w tym także metod biologii molekularnej. Być może wiele interpretacji, opartych dotąd głównie na danych ultrastrukturalnych i cytochemicznych będzie miało już tylko znaczenie historyczne.

PODZIĘKOWANIE

Składam serdeczne podziękowanie Pani Prof. dr hab. Marii Charzyńskiej z Uniwersytetu Warszawskiego za inspirującą i życzliwą dyskusję.

LITERATURA

- [1] BHANDARI N. N. 1984. The Microsporangium, W: B. M. JOHRI *Embryology of Angiosperm*, Springer, Berlin: s. 60–88.
- [2] CHAPMAN G. P. 1987. The Tapetum, *Int. Rev. Cyt.* **107**: 111–125.
- [3] CHRISTENSEN J. E., HORNER H. T., LERSTEN N. R. 1972. Pollen wall and tapetal orbicular wall development in *Sorghum bicolor* (Gramineae), *Amer. J. Bot.* **59** (1): 43–58.
- [4] CIAMPOLINI F., NEPI M., PACINI E. 1993. Tapetum development in *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae), *Pl. Syst. Evol.* **7**: 13–22.
- [5] CLEMENT C., AUDRAN J. C. 1992. Apports de la cytochimie à la connaissance des orbicules dans l'anthere de *Lilium* (Liliaceae). 1 – Le coeur orbiculaire, *Bull. Soc. bot. Fr.*, 139, *Lettres bot.* (4/5): 369–376.
- [6] CLEMENT C., AUDRAN J. C. 1993. Cytochemical and ultrastructural evolution of orbicules in *Lilium*, *Pl. Syst. Evol.* [Suppl.] **7**: 63–74.
- [7] CLEMENT C., AUDRAN J. C. 1993. Electron microscope evidence for a membrane around the core of the Ubisch body in *Lilium* (Liliaceae), *Grana* **32**: 311–314.
- [8] CLEMENT C., AUDRAN J. C. 1993. Orbicule wall surface characteristics in *Lilium* (Liliaceae), *Grana* **32**: 348–353.
- [9] ECHLIN P., GODWIN H. 1968. The ultrastructure and ontogeny of pollen in *Helleborus foetidus* L. I. The development of the tapetum and Ubisch bodies, *J. Cell Sci.* **3**: 161–174.
- [10] ECHLIN P. 1971. The role of the tapetum during microsporogenesis of Angiosperms. W: J. HESLOP-HARRISON, Pollen: development and physiology, Butterworth, s. 41–61.
- [11] ECHLIN P. 1971. Production of sporopollenin by the tapetum. W: *Sporopollenin*, red. BROOKS i wsp., Ac. Press, London, s. 220–247.
- [12] FERNANDO D. D., CASS D. D. 1994. Plasmodial tapetum and pollen wall development in *Butomus* (Butomaceae) *Amer. J. Bot.* **81** (12): 1592–1600.
- [13] GABARA B. 1978. Egzyzna: struktura, chemizm i ontogeneza, *Postępy Biologii Komórki* **5** (3): 233–259.
- [14] GAUDE T., DUMAS C. 1984. A membrane-like structure on the pollen wall surface in *Brassica*, *Ann. Bot.* **54**: 821–825.
- [15] GUBATZ S., WIERMANN R. 1992. Studies on sporopollenin in *Tulipa* anthers. III Incorporation of specifically labeled ¹⁴C phenylalanine in comparison to other precursors, *Bot. Acta* **105**: 407–413.
- [16] HESLOP-HARRISON J. 1968. Tapetal origin of pollen-coat substances in *Lilium*, *New Phytol.* **67**: 779–786.
- [17] HESLOP-HARRISON J., DICKINSON H. G. 1969. Time relationships of sporopollenin synthesis associated with tapetum and microspores in *Lilium*, *Planta* (Berl.) **84**: 199–214.
- [18] HESLOP-HARRISON J. 1972. The Anther, W: F. C. STEWARD (red.), *Sexuality of Angiosperms in Plant Physiology*, Ac. Press, New York: s.165–224.
- [19] HESS M. W., FROSCHE A. 1994. Subunits of forming pollen exine and Ubisch bodies as seen in freeze substituted *Ledebouria socialis* Roth (Hyacinthaceae), *Protoplasma* **182**: 10–14.
- [20] HESSE M. 1985. Hemispheric surface processes of exine and orbicules in *Calluna* (Ericaceae), *Grana* **24**: 93–98.
- [21] HESSE M. 1986. Orbicules and exine are homologous sporopollenin concretions in *Spermatophyta*, *Pl. Syst. Evol.* **153**: 37–48.
- [22] HOEFERT L. L. 1971. Ultrastructure of tapetal cell ontogeny in *Beta*, *Protoplasma* **73**: 397–406.
- [23] HORNER H. T., LERSTEN N. R. 1971. Microsporogenesis in *Citrus lemon* (Rutaceae), *Amer. J. Bot.* **58**(1): 72–79.
- [24] MAJEWSKA-SAWKA A., RODRIGUEZ-GARCIA M. I., NAKASHIMA H., JASSEN B. 1993. Ultrastructural expression of cytoplasmic male sterility in sugar beet (*Beta vulgaris* L.), *Sex Plant Reprod* **6**: 22–32.
- [25] KEIJZER C. J. 1987. The processes of anther dehiscence and pollen dispersal. II. The formation and the transfer mechanism of pollen-kitt, cell wall development of the loculus tissues and a function of orbicules in pollen dispersal, *New Phytol.* **105**: 499–507.
- [26] MEPHAM R. H., LANE G. R. 1969. Formation and development of the tapetal periplasmodium in *Tradescantia bracteata*, *Protoplasma* **68**: 175–192.
- [27] MISSET M. T., GOURRET J. P. 1984. Accumulation of smooth cisternae in the tapetal cells of *Ulex europaeus* L. (Papilionoideae), *J. Cell Sci.* **72**: 65–74.
- [28] MURGIA M., CHARZYŃSKA M., ROUGIER M., CRESTI M. 1991. Secretory tapetum of *Brassica oleracea* L.: polarity and ultrastructural features, *Sex. Plant Reprod.* **4**: 28–35.
- [29] OWEN H. A., MAKAROFF C. A. 1995. Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ecotype Wassilewskija (Brassicaceae), *Protoplasma* **185**: 7–21.
- [30] PACINI E., JUNIPER B. E. 1979. The ultrastructure of pollen grain development in the olive (*Olea europaea*) 2. Secretion by the tapetal cells, *New Phytol.* **83**: 165–174.

- [31] PACINI E., FRANCHI G. G., HESSE M. 1985. The tapetum: its form, function and possible phylogeny in *Embryophyta*, *Pl. Syst. Evol.* **149**: 155–185.
- [32] PACINI E. 1990. Tapetum and microspore function, W: S. BLACKMORE, R. B. KNOX (red.), *Microspores: evolution and ontogeny*, London, Ac. Press s. 213–237.
- [33] PACINI E., FRANCHI G. G. 1993. Role of the tapetum in pollen and spore dispersal, *Pl. Syst. Evol. [Suppl.]* **7**: 1–11.
- [34] POLOWICK P. L., SAWHNEY V. K. 1993. Differentiation of the tapetum during microsporogenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), with special reference to the tapetal cell wall, *Ann. Bot.* **72**: 595–605.
- [35] REZNICKOVA S. A., VAN AELST A. C., WILLEMSE M. T. M. 1980. Investigation of exine and orbicule formation in the *Lilium* anther scanning electron microscopy, *Acta Bot. Neerl.* **29** (2/3): 157–164.
- [36] REZNICKOVA S. A., WILLEMSE M. T. M. 1980. Formation of pollen in the anther of *Lilium*. II. The function of the surrounding tissues in the formation of pollen and pollen wall, *Acta Bot. Neerl.* **29** (2/3): 141–156.
- [37] RISUEÑO M. C., GIMENEZ-MARTIN G., LOPEZ-SAEZ J. F., GARCIA M. I. R. 1969. Origin and development of sporopollenin bodies, *Protoplasma* **67**: 361–374.
- [38] ROBERTSON B. L. 1984. Tapetal cell changes and sporoderm development in *Rhigozum trichotomum* (Burch.), *Ann. Bot.* **53**: 803–810.
- [39] ROWLEY J. R., SKVARLA J. J., 1974. Plasma membrane-glycocalyx origin of Ubisch body wall, *Pollen et Spores Vol. XVI*, **4**: 441–448.
- [40] ROWLEY J. R., WALLS B. 1987. Origin and structure of Ubisch body in *Pinus sylvestris*, *Acta Soc. Bot. Pol.* **56** (2): 215–227.
- [41] ROWLEY J. R., GABARAYEVA N. I., WALLS B. 1992. Cyclic-invasion of tapetal cells into loculi during microspore development in *Nymphaea colorata* (*Nymphaeaceae*), *Amer. J. Bot.* **79** (7): 801–808.
- [42] STAIGER D., KAPPELER S., MULLER M., APEL K. 1994. The proteins encoded by two tapetum-specific transcripts, Sa tap 35 and Sa tap 44, from *Sinapis alba* L. are localized in the exine cell wall layer of developing microspores, *Planta* **192**: 221–231.
- [43] STEER M.W. 1977. Differentiation of the tapetum in *Avena*, *J. Cell Sci.* **25**: 125–138.
- [44] TIWARI S. C., GUNNING B. E. S. 1986. Development and cell surface of a non-syncytial invasive tapetum in *Canna*: Ultrastructural, freeze substitution, cytochemical and immunofluorescence study, *Protoplasma* **134**: 1–16.
- [45] TIWARI S. C., GUNNING B. E. S. 1986. An ultrastructural, cytochemical and immunofluorescence study of postmeiotic development of plasmodial tapetum in *Tradescantia virginiana* L. and its relevance to the pathway of sporopollenin secretion, *Protoplasma* **133**: 100–114.
- [46] WATERKEYN L., BIENFAIT A. 1971. Primuline induced fluorescence of the first exine elements and Ubisch bodies in *Ipomoea* and *Lilium*, W: BROOKS J. i wsp., (red.), *Sporopollenin*, Academic Press, 1971 s. 108–129.
- [47] WEBER M. 1992. Nature and distribution of the exine-held material in mature pollen grains of *Apium nodiflorum* L. (*Apiaceae*), *Grana* **31**: 17–24.
- [48] ZAJĄC K. 1995. Ultrastrukturalne cechy sekrecyjnego tapetum w zarodni mchu *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid., W: Z. MIREK, J. J. WÓJCICKI (red.), *Szata roślinna Polski w procesie przemian*. Materiały konferencji i sympozjów 50 Zjazdu PTB, 26.06–01.07.1995, Kraków, Polska, Wyd. IB PAN