

J. JARANOWSKI

*Katedra Genetyki i Hodowli Roślin WSR, Poznań*

## ROZWÓJ ZARODKA I ENDOSPERMY W KRZYŻÓWKACH FORM ODDALONYCH ROŚLIN OKRYTOZALAŹKOWYCH (ANGIOSPERMAE)

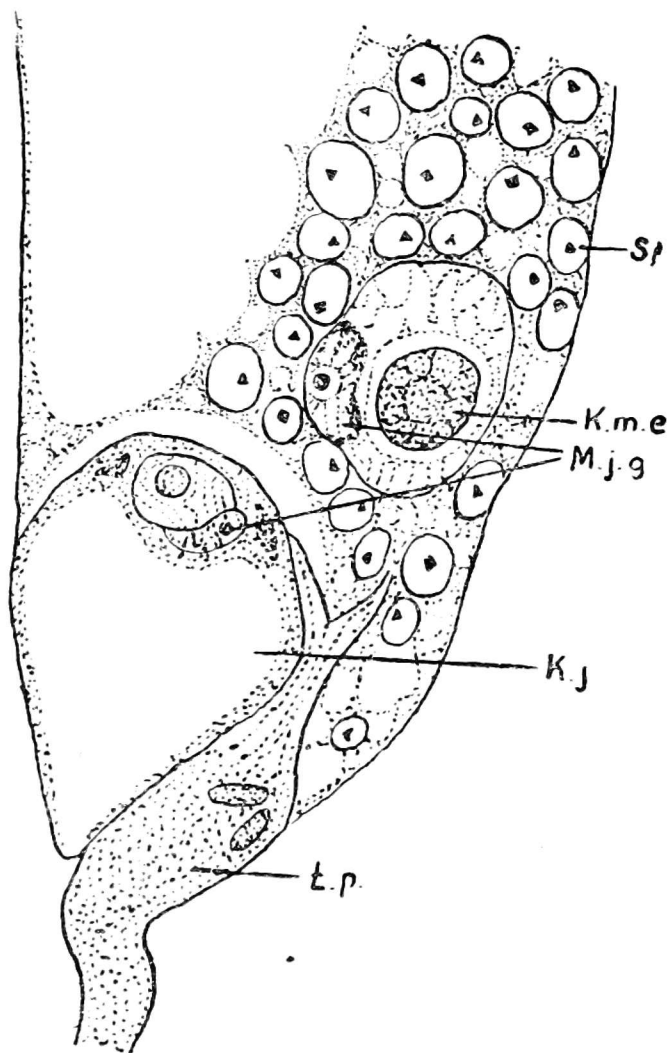
### Wstęp

Genetyka mieszańców międzygatunkowych jest przedmiotem licznych badań ostatnich lat (1, 2, 28, 29, 40, 42, 43, 44, 51). Wiąże się to z badaniami dynamiki procesów ewolucji organicznej oraz z praktyczną działalnością człowieka w przystosowywaniu roślin do jego potrzeb. W badaniach na plan pierwszy wysuwa się rozwój i istnienie barier izolacji genetycznej, które uniemożliwiają lub ograniczają możliwość wymiany genów między różnymi populacjami (5, 27, 32, 42).

Często w następstwie międzygatunkowego krzyżowania następuje zahamowanie rozwoju nasienia mieszańcowego w stadium, które uniemożliwia jego normalne kiełkowanie. W takich razach pytanie czy zamieranie nasion jest związane z pewnymi zaburzeniami rozwojowymi w samym zarodku, czy też w przylegających tkankach nasienia, ma doniosłe znaczenie teoretyczne i praktyczne. W ujęciu genetycznym nasienie u *Angiospermae* jest chimerą, składającą się z zarodka, endospermy i tkanki macierzystej, różniących się strukturą genetyczną. Wielu badaczy zakładało, że zakłócenia harmonijnego rozwoju tych genetycznie zróżnicowanych części jest przyczyną zamierania nasion mieszańcowych. Długo jednak brak było przekonujących dowodów, które by w jasny sposób tłumaczyły, która z tkanek decyduje o zahamowaniu rozwoju nasienia i kolejność zachodzących zjawisk prowadzących do tego stanu. Dopiero badania ostatnich lat rzucają nieco światła na to zagadnienie (3, 7, 11, 14, 21, 25). Wynika z nich, że przyczyną zamierania nasion mieszańcowych jest nienormalny rozwój endospermy. Te zaburzenia rozwojowe dostrzegalne są tuż po zapłodnieniu. Nienormalny rozwój endospermy prowadzi bowiem do zmian w przylegających tkankach macierzystych zalążka, które z kolei oddziałują niekorzystnie na rozwój endospermy. Zostaje ona ostatecznie zagłodzona, komórki zanikają i nasienie zamiera. Poznanie tych wszystkich zaburzeń rozwojowych leży u podstaw szukania sposobu przezwyciężenia jednej z przeszkód w krzyżowaniu oddalonych form roślin.

### Istota podwójnego zapłodnienia

U schyłku XIX w. Nawaszin i Guignard odkryli podwójne zapłodnienie u roślin okrytozalążkowych (rys. 1). Od tego czasu zjawisko to było stwierdzane jako charakterystyczne dla wszystkich gatunków, z wyjątkiem tych, gdzie ma miejsce apomiksja (9).



Rys. 1. Przekrój przez część mikropylarną woreczka zalążkowego u *Petunii* z widocznym podwójnym zapłodnieniem. Ł.p. — łagiewka pyłkowa z resztkami plazmy męskich komórek generatywnych; K.j. — komórka jajowa; M.j.g. — męskie jądra generatywne; K.m.e. — komórka macierzysta endospermy; S. — ziarna skrobi (według D. C. Coopera, 1946)

Zapłodnienie komórki jajowej u roślin kwiatowych, dające początek zygocie, a następnie zarodkowi, może być porównane z tym procesem zachodzącym również u zwierząt i roślin niższych. Łączenie się natomiast drugiego jądra męskiego z jednym lub kilkoma jądrami gametofitu żeńskiego dla powstania pierwotnego jądra endospermy jest zjawiskiem charakterystycznym tylko dla roślin kwiatowych. Długi okres czasu utrzymywało się przekonanie, że tkanka powstała z pierwotnej komórki endospermy jest niezróżnicowana i w ten sposób opisywano to w wielu czołowych podręcznikach traktujących o historii życia roślin. Jeśli prawda jest, że jest to tkanka, która dostarcza pokarmów dla rozwijającego się zarodka, a w wielu gatunkach pozostaje nawet w dojrzałych nasionach jako dodatkowy materiał zapasowy pokarmów dla młodej siewki w początkowym okresie wzrostu, błędem byłoby utrzymywanie, że jest to tkanka niezróżnicowana. Wręcz odwrotnie, jak stwierdzono ostatnio, istnieje progresywne różnicowanie się endospermy w czasie rozwoju nasienia (14).

## Właściwości gametofitu żeńskiego i różne typy rozwoju endospermy

U większości gatunków roślin okrytozalążkowych (około 90% dotychczas przebadanych) gametofit żeński powstaje z jednej spory w następstwie podziałów mejotycznych i wszystkie jądra posiadają podobny komplet materiału dziedzicznego. Spotyka się dwa typy gametofitów żeńskich — jeden posiadający dwujądrową komórkę macierzystą endospermy zwany typem pospolitym oraz drugi, mający jednojądrową komórkę macierzystą endospermy, jak stwierdzono to w rodzaju *Onagraceae*, zwany typem *Oenothera*. Gametofit żeński u *Allium* powstaje z końcowego produktu mejozy I i stąd poszczególne jądra mogą mieć różną strukturę genetyczną. U innych znowu gatunków wszystkie 4 jądra, końcowy produkt mejozy II, uczestniczą w tworzeniu gametofitu i liczba komórek wchodzących w jego skład waha się od 3 do 13, lub nawet więcej. Gametofit żeński u *Gramineae*, chociaż w początku powstawania jest typowy, w późniejszym okresie staje się wielokomórkowy, ponieważ mają miejsce dodatkowe mitozy w antypodach i nawarstwienie się tej tkanki.

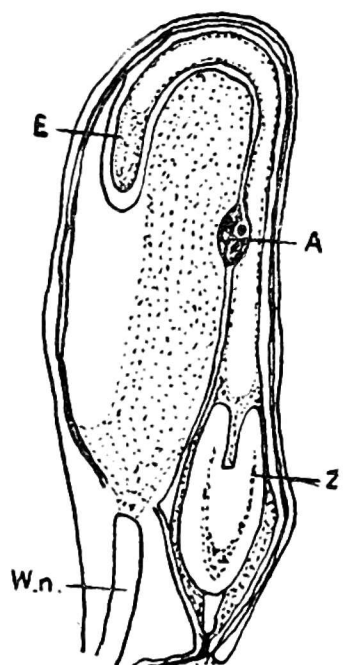
W okresie tuż przed zapłodnieniem ustaje prawie zupełnie aktywność merystematyczna we wszystkich częściach zalążka i zalążni. Krótko po zapłodnieniu rozpoczynają się szybkie podziały komórkowe w endospermie i w zygocie oraz wznawiają się w przyległych tkankach macierzystych. Te ostatnie podziały są konieczne dla umożliwienia rozrastania się endospermy i zarodka w nasieniu oraz nasienia w zalążni.

Endosperma odgrywa główną rolę w rozwoju nasienia, ponieważ stanowi ona korzystne środowisko dla wzrostu i różnicowania się zarodka. W większości przypadków endosperma jest wykorzystana w czasie rozwoju nasienia, ale w niektórych rodzinach staje się ona częścią zapasową materiałów pokarmowych, co jest jej drugą funkcją dodatkową do pierwotnej. Jakkolwiek endosperma i zarodek u roślin obcopylnych pochodzą z zapłodnienia, różnią się one we właściwościach dziedzicznych. W większości przypadków endosperma jest triploidalna (kiedy pochodzenie gametofitu żeńskiego jest monosporyczne), natomiast u *Onagraceae*, gdzie komórka macierzysta endospermy jest jednojądrowa, jest diploidalna. W gatunkach, u których gametofit żeński jest wynikiem di- lub tetrasporycznego rozwoju, endosperma może być od  $3n$ , jak np. u *Allium*, do  $15n$ , jak u niektórych gatunków *Peperomia*.

Rozróżnia się trzy podstawowe typy rozwoju endospermy oraz ich liczne warianty. Najczęściej spotyka się typ jądrowy, gdzie jądro komórki macierzystej endospermy przechodzi szereg podziałów mitotycznych i powstaje wielojądrowa komórka. Te podziały są szybkie i jądra znajdują się w warstwie cytoplazmy otaczającej dużą, centralną wakuolę szybko powiększającej się komórki. Ekspansja komórki endospermy od-

bywa się kosztem otaczającej tkanki ośrodka (*nucellus*) i kiedy ta ostatnia zostaje zużyta, następuje cytokineza i endosperma staje się wielokomórkowa. W tym czasie nici wrzeciona podziałowego są w ten sposób zorientowane, że centralna część wakuoli zostaje zapełniona komórkami endospermy. Okres czasu, w którym endosperma jest w postaci wielojądrowej i liczba jąder tuż przed cytokinezą waha się w znacznych granicach. Liczba jąder w okresie, gdy endosperma staje się komórkowa, wynosi np. tylko 4 u *Coffea*, kilkaset u *Zea*, lub kilka tysięcy, jak u *Asparagus* i *Cocos*.

Zwykle w dalszych fazach rozwoju cała endosperma jest wielokomórkowa ale jest szereg gatunków, w których mniejsza lub większa część pozostaje wielojądrowa. Tworzenie komórek może być ograniczone do części peryferycznych endospermy, a część środkowa pozostaje wolnojądrowa, lub komórki powstają tylko w części mikropylarnej, natomiast brak ich w części chalazalnej. Endosperma w części chalazalnej może tworzyć wypustki ssące (*haustoria*), które przenikają do przylegającej tkanki macierzystej i wykorzystują dostępne pokarmy, a w niektórych przypadkach osiągają szczytową część tkanki przewodzącej w sznureczku (*funiculus*) i powodują stworzenie prostej drogi dla przechodzenia pokarmów do zarodka. Ciekawy przykład tego rodzaju rozwoju można obserwować u *Oxybaphus* (19) (rys. 2). część chalazalna wielojądrowej endospermy staje



Rys. 2. Przekrój przez rozwijające się nasienie u *Oxybaphus nyctagineus*. Szczytowa część endospermy (E) rośnie wokół części peryferycznych ośrodka. Antypody (A) pozostają w pozycji pierwotnej. Z — zarodek; W.n. — wiązka naczyniowa (według Coopera, 1949)

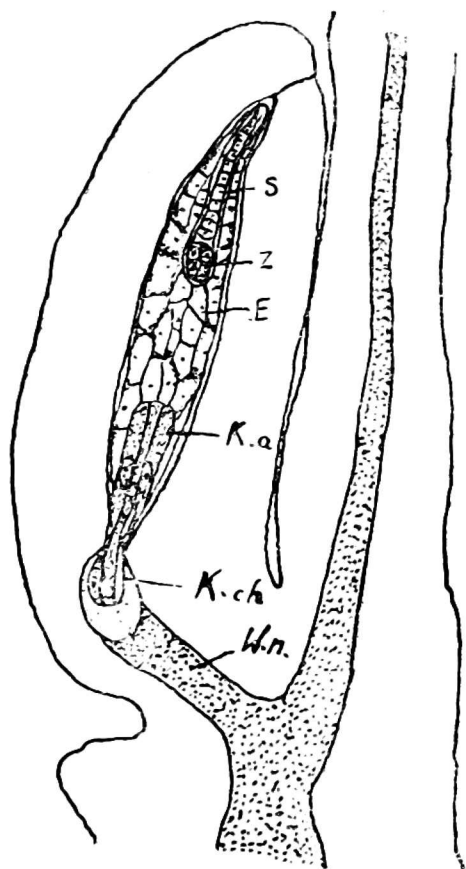
się stożkowa i posuwa się w kierunku dookoła części centralnej, z której powstaje perisperm, aż osiągnie miejsce tuż naprzeciwległe tkance przewodzącej sznureczka. Podział komórkowy jest ograniczony tylko do części mikropylarnej endospermy, która tworzy kołnierz lub czapeczkę na końcu korzonka.

Podział jądrowy w endospermie we wczesnych stadiach rozwoju nasienia jest w ten sposób synchronizowany z mitozami zarodka, że liczba jąder w pierwszym jest w przybliżeniu równa liczbie komórek w drugim.

Podział jądrowy jest z reguły połączony w dalszym ciągu z podziałem komórkowym w komórkowym typie rozwoju endospermy. Gametofit żeński rozwija się kosztem tkanki ośrodka i w czasie zapłodnienia, w większej części przylega tuż do integumentu wewnętrznego. W następstwie zapłodnienia tworzy się endosperma komórkowa, która wcześniej się różnicuje i komórki peryferyczne przylegające do kieszonki chalazalnej posiadają silnie zagęszczoną cytoplazmę i stają się tkanką absorbującą. Nieraz te komórki wydłużają się i wchodzą w bezpośredni kontakt z komórkami sznureczka (*funiculus*) i tworzą pomost pomiędzy tkanką naczyniową i rozrastającą się endospermą. Komórki te pozostają zwykle jednojądrowe, chociaż mogą stać się również wielojądrowe u niektórych gatunków. Zaczątki tych komórek pojawiają się w różnym okresie po zapłodnieniu. U pewnych gatunków np. *Phryma* (18) pojawiają się one tuż po pierwszych podziałach endospermy. Wówczas komórka macierzysta endospermy dzieli się poprzecznie i główna część endospermy powstaje z komórki leżącej po stronie mikropylarnej. W wyniku dwóch następujących po sobie podłużnych podziałów od strony chalazalnej powstają 4 komórki. Komórki te więcej się nie dzielą, lecz powiększają i wydłużają, aż osiągną kieszonkę chalazalną i zaczynają spełniać funkcję haustorium, tzn. resorbować pokarmy z tkanki naczyniowej poprzez tę kieszonkę chalazalną (rys. 3). Kiedy nasienie zaczyna dojrzewać, komórki kieszonki chalazalnej oraz tkanek przyległych pozbawione są wszelkiej zawartości.

Trzeci typ rozwoju endospermy ma miejsce w szeregu gatunków, a ponieważ jest on charakterystyczny dla gatunku *Helobiae*, określa się go jako typ helobialny. Komórka macierzysta endospermy dzieli się poprzecznie i tworzy dwie komórki nierównej wielkości. Jądro komórki mikropylarnej podlega szeregowi podziałów mitotycznych, w wyniku czego powstaje duża wielojądrowa komórka. W dalszym ciągu następują cytokinezy i endosperma przylegająca do zarodka staje się komórkowa. Jądro natomiast dużej komórki od strony chalazalnej może nie dzielić się w ogóle, lub przechodzi tylko krótką serię podziałów tworząc wielojądrową komórkę, która pozostaje w tym stadium w dalszym ciągu rozwoju nasienia. Przykład tego typu rozwoju znajdujemy u *Armoracia lapathifolia* (45, 52). Gatunek ten rozmnaża się normalnie przez cięcie korzenia; trudno jest z niego otrzymać nasiona. Niemniej można uzyskać normalnie nasiona, jeżeli rośnie on w odpowiednich warunkach. Chrzan jest bowiem zupełnie samobezpłodny. Trzeba mieć koniecznie klony tzw. typu normalnego (pospolitego) i typu „Bohemian”, rosnące w bliskim sąsiedztwie, ażeby nastąpiło krzyżowe zapylenie. Endosperma w nasieniu

rozwija się według typu helobialnego. Pierwszy podział komórki macierzystej endospermy jest zupełny i powstają dwie komórki. W dalszym ciągu następują podziały jądrowe i tworzą się dwie komórki wielojądrowe. Szybkość podziału w komórce mikropylarnej jest większa aniżeli w komórce chalazalnej. Tworzenie komórek zaczyna się w okolicach zarodka i postępuje dalej, aż cała część mikropylarna jest wypełniona endospermą



Rys. 3. Przekrój podłużny przez młode nasienie u *Phryma leptostachya*. S — suspensor; Z — zarodek; E — endosperma; K.a. — komórki absorbcyjne endospermy; K.ch. — kieszonka chalazalna; W.n. — wiązka naczyniowa (według Coopera, 1941)

komórkową. Komórka chalazalna endospermy pozostaje wielojądrowa jako organ pobierający i przekazujący pokarm rosnącej endospermie i zarodkowi.

Mogą być różne odchylenia rozwojowe endospermy w typie „Helobial”. Po pierwszym podziale komórka mikropylarna może dzielić się dalej, tak że powstają 3—4 komórki w ułożeniu liniowym. Komórka, lub komórki środkowe dają początek endospermie komórkowej. Komórka szczytowa natomiast powiększa się, przenika przez otwór mikropylarny i rozgałęzia się w przylegających tkankach macierzystych, stając się narządem absorbującym pokarmy. Natomiast komórka leżąca u podstawy staje się dwu lub wielojądrowa i rozszerza się, tworząc narząd absorbujący między główną masą endospermy i szczytem tkanek przewodzących.

W wielu rodzinach roślin endosperma jest znacznie zredukowana, szczególnie u *Orchidaceae* i *Podostomaceae*. Według wcześniejszych badań pierwotne jądro endospermy u tych roślin nie dzieli się. Jednak późniejsze prace wskazują, że u orchidei jest bardzo słabo rozwinięta endosperma.

Brak natomiast w dalszym ciągu bliższych badań nad rozwojem nasienia u *Podostomaceae*. W obu tych rodzinach komórki suspensora powiększają się silnie i przenikają do tkanek macierzystych w okolicy mikropylarnej.

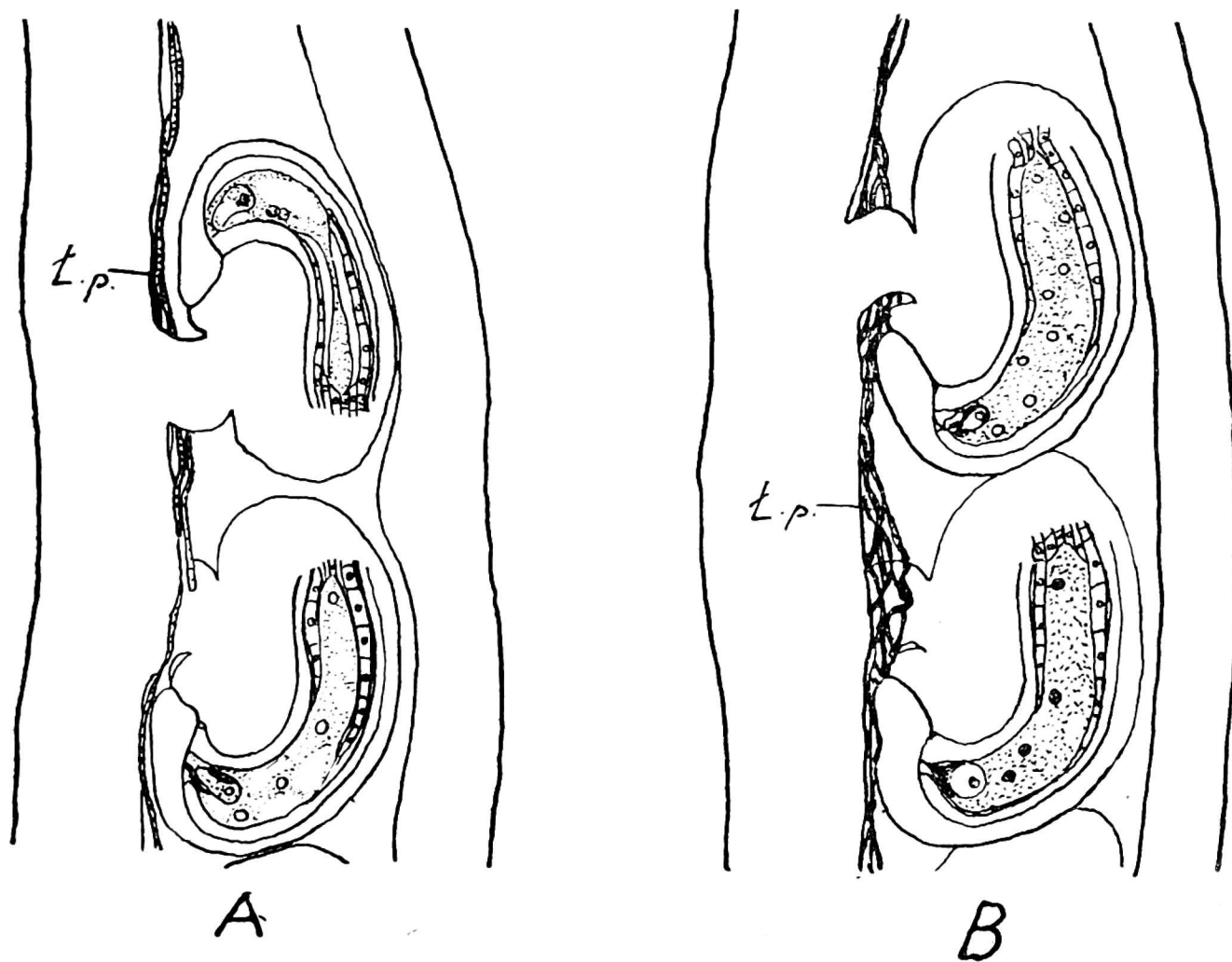
### *Rola endospermy w rozwoju nasion*

Powiązanie niedorozwoju nasion i opadania owoców interesuje wielu badaczy i sadowników od z górami 50 lat i na ten temat nagromadziła się obszerna literatura. Proporcjonalnie mała ilość kwiatów u drzew owocowych wiąże owoce, które dojrzewają. Np. u jabłoni stanowi to zwykle mniej niż 10%. Pozostałe opadają w trzech falach, określanymi jako pierwsze, drugie i „czerwcowe” opadanie. W następstwie krzyżowego zapylenia właściwymi (compatible) zapyłaczami opad wyraźnie się zmniejsza. Niewątpliwie odpowiednie rozmieszczenie w sadach handlowych różnych form może warunkować właściwe, krzyżowe zapylenie. W efekcie uzyskuje się wówczas mniejszy procent opadania owoców i większy procent dorodnych owoców handlowych.

Badania nasion owoców, które opadają w okresie po kwitnięciu, wykazały obecność zarodków i słabo rozwiniętej endospermy w powiązaniu z przerostem ośrodków. Niektóre z wczesnie dojrzewających odmian charakteryzują się niedorozwiniętymi lub zaschniętymi nasionami, podczas gdy późno dojrzewające odmiany tworzą duże i żywotne nasiona. W licznych przypadkach zapylenie i zapłodnienie jest warunkiem koniecznym dla rozwoju owocu. Zdarza się, że nasiona zamierają, ale owoc rozwija się dalej. Końcowym produktem są tzw. „beznasienne” pomarańcze, grapefruity lub winogrona. Żadne jednak z nich nie są prawdziwie beznasienne. Zawsze można w nich znaleźć pozostałości niedokształconych nasion. Różne stopnie „beznasienności” zostały stwierdzone u winogron, ale żaden klon nie okazał się stabilny w odniesieniu do tego zjawiska. Wcześniejsze badania stwierdziły, w jakim stopniu rozwój nasion jest kierowany przez genotyp mateczny i jest niezależny od pochodzenia pyłku. Sposób zamierania nasienia nie był zupełnie badany, ale z danych dotyczących tego zagadnienia wynika, że ma tam miejsce silny przerost tkanki macierzystej w powiązaniu ze słabym rozwojem endospermy. W 1-miesięcznych nasionach mały, kulisty zarodek, połączony z wąskim centralnym cylindrem niedorozwiniętej endospermy jest otoczony dużą ilością tkanki macierzystej.

Analiza porównawcza rozwoju endospermy w normalnym nasieniu z rozwojem w nasionach, które zamierają w różnych stadiach ontogenezy, daje lepszą ocenę właściwości endospermy i jej roli jako źródła pokarmów dla rosnącego zarodka. Np. *Medicago sativa* produkuje dużo nasion przy obcozapyleniu, ale w następstwie przymuszonego samozapylenia żywotne nasiona wytwarzane są tylko sporadycznie (22). Ta niska płod-

ność nie jest jedynie wynikiem małego stopnia zapylenia (rys. 4), ale dużej częstotliwości zamierania nasion w czasie ich rozwoju. Chociaż 15% zalążków jest zapłodnionych przy samozapyleniu, to spośród nich około 39% zamiera w okresie 6 dni po zapyleniu. Przy obcozapyleniu endosperma rozwija się bardzo szybko i wydaje się, że odgrywa dominującą rolę w ontogenezie nasienia. Aktywność merystematyczna w tkankach przylega-



Rys. 4. Podłużny przekrój szczytowej części zalążni u *Medicago sativa*. A. — 30 godz. po samozapyleniu. Dolny zalążek zapłodniony. Mała ilość łagiewek pyłkowych (Ł.p.). B. — 30 godz. po obcozapyleniu. Obydwa zalążki zapłodnione. Duża ilość łagiewek pyłkowych (Ł.p.), szczególnie w okolicach mikropylarnych (według Coopera i Brinka, 1940)

jących jest w sam raz wystarczająca dla stworzenia miejsca dla rosnącej tkanki endospermalnej i zarodka. W następstwie inbrodu endosperma rozwija się wolno, stąd szybki rozwój tkanki otaczającej nie jest równoważony, w wyniku czego następuje przerost (*hyperplasia*) integumentu wewnętrznego i w konsekwencji zamknięta endosperma zostaje zagłodzona i ostatecznie zamiera.

Zarodki natomiast rozwijają się normalnie tak długo, dopóki są jeszcze ślady endospermy, a potem zamierają. Zamieranie nasion jest więc powiązane z niezdolnością endospermy dla zachowania normalnej równowagi z wzrostem przylegającej tkanki macierzystej nasienia.



## Rozwój nasion w krzyżówkach form oddalonych

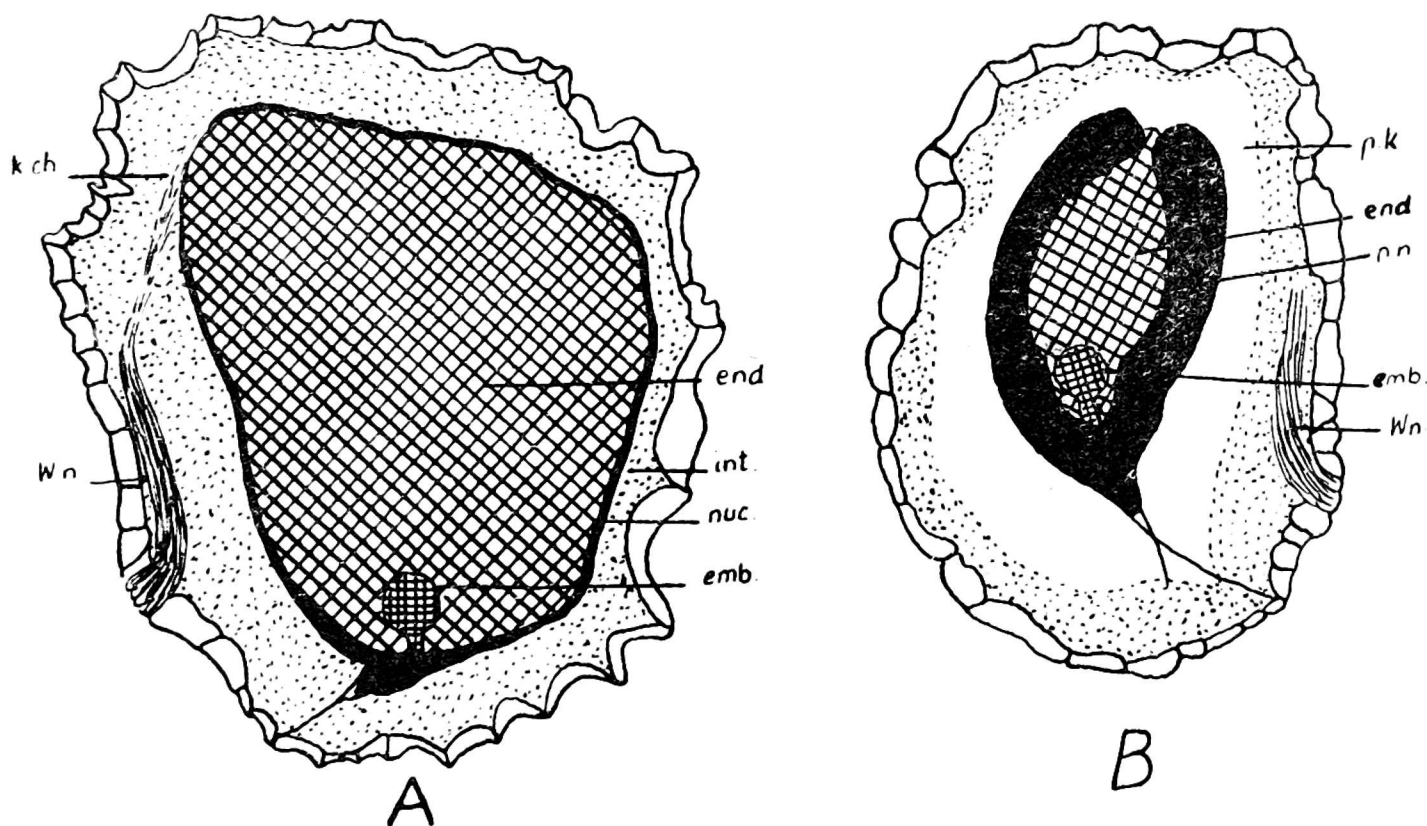
Rośliny grupy *Solanaceae* rosnące we właściwych warunkach środowiska mają tendencje produkowania dużej ilości nasion. W wyniku kojarzenia międzygatunkowego czy nawet międzyrodzajowego często zapłodnienie przebiega normalnie, niemniej rzadko uzyskuje się nasiona zdolne do kiełkowania, a z reguły są one niedorozwinięte i nieżywotne. Przebieg rozwoju nasienia i jego ewentualne zamieranie w wyniku samozapyłania i międzygatunkowego krzyżowania był badany w obrębie rodzajów: *Nicotiana*, *Lycopersicon* i *Solanum* (3, 4, 8, 26, 36, 49, 55).

*Nicotiana rustica* ( $n = 24$ ) przy samozapyłaniu daje pełen komplet dobrze wykształconych kiełkujących nasion. Zapłodnienie ma miejsce gdzieś po 24 godz. po zapyleniu i rozwój nasienia jest bardzo szybki. Endosperma wydaje się spełniać rolę dominującą w rozwijającym się nasieniu i szybko tworzy się bezpośrednia łączność pomiędzy nią i tkanką przewodzącą w sznureczku (*funiculus*). Zewnętrzne komórki endospermy, bezpośrednio stykające się z kieszonką chalazalną, różnicują się w tkankę absorbcyjną. Wewnętrzny integument pozostaje jako pojedyncza warstwa komórek i rozrasta się, ażeby stworzyć miejsce rosnącej endospermie.

W następstwie skrzyżowania z *N. glutinosa* ( $n = 12$ ), *Lycopersicon esculentum* ( $n = 12$ ) i *Petunia violacea* ( $n = 7$ ) rozwój nasion jest zapoczątkowany, ale następnie one zamierają. Zapłodnienie opóźnia się o 24 godz. i więcej a jego częstotliwość jest znacznie zredukowana. Mieszkańcowy zarodek rozwija się normalnie, aż do momentu zamierania nasienia. Z drugiej strony endosperma mieszańcowa rozwija się wolniej i nie tworzy się bezpośrednie połączenie między nią a tkankami przewodzącymi. *Hyperplasia endothelium* towarzyszy zwykle wolnemu wzrostowi endospermy, tak że w ostateczności zostaje ona odizolowana od źródła pokarmu. Integument zamierającego nasienia jest wypełniony zapasowymi materiałami pokarmowymi, co wskazuje, że zamieranie nasienia nie jest wynikiem braku pokarmu. Zamieranie nasienia przed osiągnięciem pełni dojrzałości jest wynikiem przede wszystkim opóźnienia rozwoju endospermy. Wtórne zjawiska, jak *hyperplasia endothelium* prowadząca do zablokowania endospermy, brak wytworzenia i zróżnicowania tkanki przewodzącej w sznureczku i nienormalne magazynowanie pokarmów w integumencie, prowadzą do zagłodzenia endospermy i związanego z nią zarodka. Zagłodzenie i zamieranie nasienia jest więc raczej wynikiem złego rozdziału pożywienia, a nie jego braku w początkowym okresie rozwoju.

Kiedy *N. tabacum* ( $n = 24$ ) w krzyżówce *N. rustica*  $\times$  *N. tabacum* użyje się jako formę ojcowską, endosperma rozwija się szybciej aniżeli w krzyżówce *N. rustica*  $\times$  *N. glutinosa* (10), ale nie osiąga szybkości rozwoju *N. rustica* przy samozapyleniu (rys. 5). Podobne serie zmian histologicz-

nych zachodzą w rozwijającym się nasieniu, ale w wielu wypadkach przerastające *endothelium* nie oddziela zupełnie endospermy od kieszonki chalazalnej. W takich nasionach endosperma pobiera trochę pokarmów, tak że rozwija się w dalszym ciągu, a z nią również zarodek. Komórki integumentu tracą swoją zawartość w miarę postępu wzrostu (rys. 5 B). Zasadnicza różnica w nasionach tych 2 typów krzyżówek jest ta, że wiele nasion z krzyżówki *N. rustica* × *N. tabacum* rozwija się aż do dojrzenia torebek. Chociaż nasiona są małe, niedokształcone, kilka z nich może kiełkować. Żywotność tych nasion ocenia się mniej jak 1%.



Rys. 5. Przekrój przez rozwijające się nasiona 144 godz. po zapłodnieniu. A. — *Nicotiana rustica* przy samozapyleniu. Widoczne bezpośrednie połączenie endospermy (*end.*) z wiązką naczyniową (*W.n.*) sznureczka poprzez kieszonkę chalazalną (*K.ch.*). Integument (*int.*) wypełniony materiałami zapasowymi. Tkanka ośrodka (*nuc.*) w zaniku. B. — *Nicotiana rustica* × *N. tabacum*. Wyraźny przerost tkanki ośrodka (*p.n.*), brak bezpośredniego kontaktu endospermy (*end.*) z tkankami przewodzącymi (*W.n.*); część niezakropkowana integumentu składa się z pustych komórek (*p.k.*) (według Brinka i Coopera, 1941)

Podobny przebieg zamierania nasion ma miejsce kiedy *Lycopersicon* i *Petunia* użyje się jako zapylaczy. Podwójne zapłodnienie zachodzi w obu przypadkach, ale wolniejszy rozwój endospermy i *hyperplasia endothelium* powodują zamieranie nasion jeszcze wcześniej, aniżeli w następstwie skrzyżowania *N. rustica* × *N. glutinosa*. Obecność 55 chromosomów w mitozach endospermy krzyżówki *N. rustica* × *P. violacea* wskazuje, że zapłodnienie faktycznie ma miejsce.

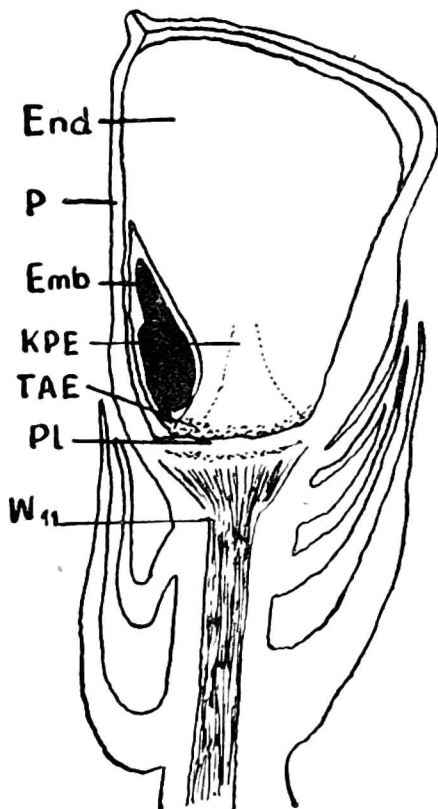
Podobny przebieg zjawisk zachodzi przy oddalonych krzyżówkach u *Lycopersicon* (24). Dwie linie *L. pimpinellifolium*, diploidalna i tetraploidalna oraz *L. peruvianum* były użyte do badań. Linie *L. pimpinellifolium* zachowywały się zupełnie odmiennie, gdy były wzięte jako zapylacze zarówno przy wzajemnym krzyżowaniu, jak i krzyżowaniu z *L. peruvianum*. Podwójne zapłodnienie ma zawsze miejsce przy różnych kojarzeniach. Pełne, dorodne nasiona uzyskano w krzyżówkach *L. pimpinellifolium*  $2n \times 4n$ ,  $4n \times 4n$  i *L. pimpinellifolium*  $4n \times L. peruvianum$ . Natomiast tylko niedokształcone nasiona uzyskano w krzyżówkach *L. pimpinellifolium*  $4n \times 2n$  i *L. pimpinellifolium*  $2n \times L. peruvianum$ . Tak jak u *Nicotiana* tylko ta część endospermy, która bezpośrednio przylega do kieszonki chalazalnej w normalnie rozwijającym się nasieniu, różnicuje się w tkankę absorbującą i endosperma szybko się rozprzestrzenia, a endothelium pozostaje jako pojedyncza warstwa komórek. W następstwie tych krzyżówek, gdzie uzyskuje się niedokształcone, nieżywotne nasiona brak jest zróżnicowania tej części endospermy i chociaż te dwie tkanki pozostają w bliskim kontakcie, materiały zapasowe zamiast przechodzić do endospermy nagromadzone są w kieszonce chalazalnej.

Komórki endospermy powiększają znacznie swoją wielkość w wyniku krzyżówki *L. pimpinellifolium*  $2n \times L. peruvianum$ . Podobnie jądra stają się bardzo duże i są wielojąderkowe, co wskazuje na ich poliploidalność. W miarę wzrostu nasienia ścianki komórek endospermy w okolicach zarodka zanikają i znajduje się on w pojedynczej komórce endospermy z olbrzymim jądrem. Zanikanie błon komórkowych i łączenie jąder przebiega dalej, aż cała endosperma zamienia się w utwór złożony z kilku lub nawet tylko jednej komórki z jednym nienormalnie dużym jądrem. W czasie zanikania endospermy zarodek rozwija się i różnicuje w normalny sposób.

Zapłodnienie i następnie zamieranie nasion zachodzi w wielu przypadkach przy międzygatunkowym krzyżowaniu w obrębie rodzaju *Solanum* (3, 26, 36, 49), zarówno na poziomie diploidalnym, jak i poliploidalnym (tetraploidalnym i heksaploidalnym). Przebieg zamierania nasion jest podobny we wszystkich przypadkach. Endosperma rozwija się wolno i brak jest jej normalnego różnicowania. Endothelium staje się hyperplastyczne, tworząc wielowarstwową tkankę bezpośrednio otaczającą endosperme. Zarodek rozwija się do momentu, kiedy ślady endospermy zostają zużyte, a potem zamiera. W wielu wypadkach zarodek przed zamieraniem osiąga stadium tzw. „torpedo”. Utrzymanie przy życiu takiego zarodka możliwe jest zupełnie poprzez jego wyizolowanie i hodowlę na właściwej pożywce.

Blakeslee i współpracownicy obserwowali podobne przerosty endothelium przy krzyżówkach międzygatunkowych w obrębie rodzaju *Datura* (39, 41). Określili oni te przerosty jako „tumory zalążniowe”. Mnożenie bowiem komórek endothelium powodowało tworzenie rosnącej do wewnątrz tkanki tumoralnej. Według nich tkanka tumoralna rośnie raczej kosztem endospermy, a nie działa jako przeszkoda dla uzyskania przez nią niezbędnych pokarmów dla ciągłego wzrostu. Niemniej fakt, że przylegająca tkanka integumentu jest zużyta w czasie zamierania endospermy, wskazuje, że raczej integument jest źródłem pokarmów dla przerastającego endothelium, a nie endosperma. Zarodek znów rozwija się do momentu wykorzystania całej endospermy i zamiera.

Przejdźmy teraz do *Gramineae*. Tkanka epidermalna endospermy, przylegająca do placenty w normalnie rozwijającym się ziarnie kukurydzy, różnicuje się w warstwę absorbującą, w czasie kiedy tkanka ośrodka (*nucellus*) została zużyta. Dzieje się to około 12 dni po zapyleniu. Od tego momentu endosperma rozwija się szybko, tworząc tkankę zapasową ziarna. Istnieje bardzo aktywna część merystematyczna placenty i szybki przerost komórek po stronie od endospermy. W czasie dojrzewania ziarna komórki te stopniowo są opróżniane z ich zawartości (rys. 6).

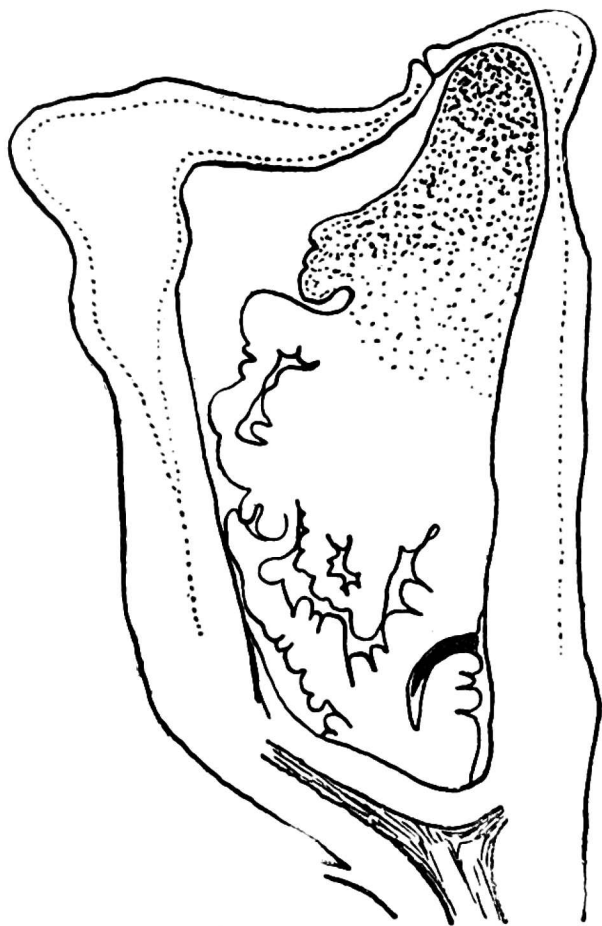


Rys. 6. Przekrój przez rozwijający się ziarniak kukurydzy 12 dni po zapyleniu. *End.* — endosperma; *P* — pericarp; *Emb.* — zarodek; *KPE* — komórki „przewodzące” endospermy; *TAE* — tkanka absorbcyjna endospermy; *Pl.* — placenta; *Wn.* — wiązka naczyniowa (według Brinka i Coopera, 1947)

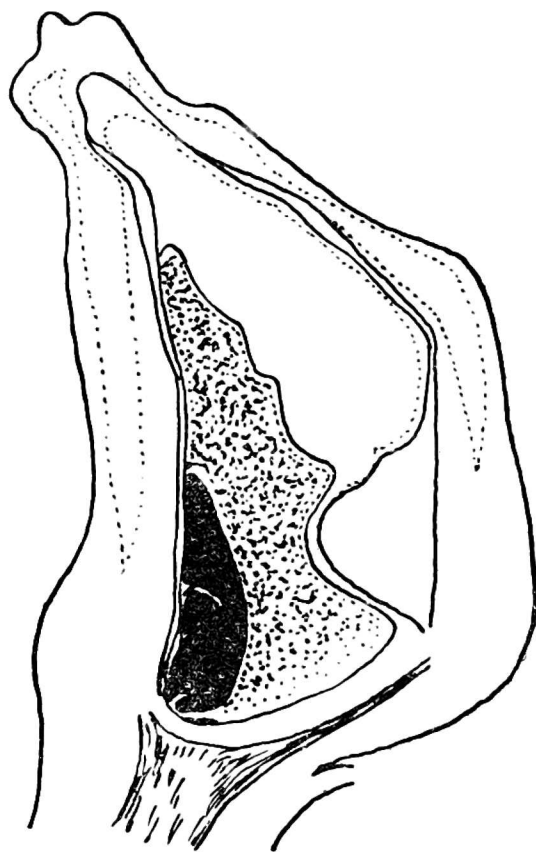
Linia kukurydzy homozygotyczna w odniesieniu do genu *de 17* daje niedokształcone pomarszczone nasiona (15). Endosperma rozwija się wolno i duża część nucellusa jest obecna nawet po 12 dniach. Warstwa epidermalna u podstawy endospermy pozostaje niezróżnicowana. Stąd jest wolniejsza absorbcja pokarmów w tej okolicy, a komórki placenty zatrzymują dużo z ich zawartości. W wyniku tego ograniczone jest gromadzenie

materiałów zapasowych w endospermie. Zarodek jednak rozwija się normalnie, tak że wiele ziarn może skiełkować.

Zróznicowanie części absorbcyjnej jest częściowo lub zupełnie ograniczone w wyniku krzyżowania rodów kukurydzy  $2n \times 4n$  i  $4n \times 2n$  (20). Następuje wówczas nienormalny rozwój endospermy i ziarniaki zamierają w różnych fazach wzrostu, tak że względnie mała ich ilość uzyskuje stan zdolności kiełkowania. W krzyżówce  $2n \times 4n$  endosperma w okolicach zarodka staje się nienormalnie merystematyczna i jest on w niej



Rys. 7. Przekrój przez ziarniak kukurydzy 24 godz. po skrzyżowaniu form  $2n \times 4n$ . Widoczny zanikający mały zarodek. Nienormalny przerost endospermy w częściach zewnętrznych i wrastanie tych tkanek ku środkowi. Szczytowa część endospermy wypełnia się ziarnami skrobi (według Coopera, 1951)



Rys. 8. Przekrój przez ziarniak kukurydzy 16 dni po skrzyżowaniu form  $4n \times 2n$ . Endosperma jest przedwcześnie wypełniona ziarnami skrobi (według Coopera, 1951)

głęboko zatopiony. Część endospermy u podstawy (absorbcyjna) pozostaje niezróznicowana. Środkowa część natomiast zaczyna zanikać, a otaczająca endosperma staje się nieprawidłowo merystematyczna, tworząc coś w rodzaju tumoralnych wypustek, które przenikają do części środkowej. Podobny przerost ma miejsce w częściach powierzchniowych endospermy, tworząc zdecydowanie nienormalną tkankę. Większość zarodków zanika w czasie tych nienormalności rozwojowych endospermy (rys. 7).

Nieco inny typ rozwoju ma miejsce po skrzyżowaniu  $4n \times 2n$ . Następuje tu przedwczesne gromadzenie materiałów zapasowych w endospermie, poprzedzające normalne zróżnicowanie zarodka. Bardzo mało, albo w ogóle nie ma wówczas pokarmów w zarodku. Nieosiągnięcie przez ziarniak zdolności kiełkowania jest znów wynikiem nienormalnego rozwoju endospermy w połączeniu z zagłodzeniem zarodka (rys. 8).

Endosperma zarówno u *Hordeum jubatum* ( $n = 14$ ), jak i u *Secale cereale* ( $n = 7$ ) rozwija się bardzo szybko po zapłodnieniu (23). Już po 4 godz. po zapyleniu można zaobserwować podziały pierwotnego jądra endospermy. Następnie endosperma żyta rozwija się trochę wolniej aniżeli *H. jubatum*. U tego ostatniego swobodny podział jąder następuje tak szybko, że po 32 godzinach jest ich już 128 albo 256. Średnia liczba jąder w 22 ziarnach wynosi 157. Krótco potem rozpoczyna się podział komórek w okolicach zarodka i postępuje w kierunku części chalazalnej. Po 48 godz. zarodek jest już zatopiony w masie komórek, a pojedyncza warstwa komórek otaczająca środkowe światło woreczka zalążkowego tworzy podstawową część endospermy. W trakcie tego rozwoju endosperma rośnie poza komórki antypodalne gametofitu żeńskiego, stąd znajdują się one pomiędzy endosperma i bocznie ułożonymi wiązkami naczyniowymi. Środkowe światło woreczka zalążkowego jest stopniowo wypełniane komórkami i po 3 dniach endosperma jest kompletnie w postaci komórek. Antypody można obserwować jeszcze dwa dni po zapłodnieniu, ale potem zaczynają już ginąć i po 3 dniach są obecne tylko ich ślady.

Magazynowanie skrobi rozpoczyna się w środkowej części endospermy i już po 4 dniach sporo skrobi jest obecnej w tej części. W tym okresie podziały komórkowe są ograniczone do zewnętrznych warstw endospermy. Komórki zewnętrzne, naprzeciw wiązek naczyniowych, różnicują się w tkankę absorbcyjną, a tkanka pomiędzy endosperma i wiązkami zanika. W okolicach wiązek naczyniowych pojawia się aktywna tkanka merystematyczna. Powstająca w ten sposób nowa tkanka progresywnie zanika, gdyż jest trawiona przez rosnącą endospermę. Podobnie komórki endospermy przyległe do zarodka są również przezeń trawione.

Endosperma żyta rozwija się nieco wolniej aniżeli u *H. jubatum* i po trzech dniach osiąga stadium podobne, jak *H. jubatum* uzyskuje po dwóch dniach. Jeszcze po 5 dniach można widzieć światło środkowe w woreczku zalążkowym, ale krótko potem ono zanika.

Po skrzyżowaniu *H. jubatum*  $\times$  *S. cereale* następuje zapłodnienie i rozpoczyna się rozwój zarówno endospermy, jak i zarodka. Endosperma rozwija się zupełnie odmiennie niż u obu form rodzicielskich. Podział pierwotnego jądra endospermy albo w pierwszej mitozie, albo w dalszych

jest zdeorganizowany i powoduje powstanie nieregularnej liczby jąder, różniących się także wielkością i kształtem. Mimo tych nieprawidłowości endosperma wydłuża się i przerasta poza antypody, tak że te ostatnie w dalszych okresach rozwoju znajdują się w położeniu bocznym. Endosperma jest bezpostaciowa i można ją jeszcze obserwować w ziarnach po 11—13 dniach. Antypody są widoczne do 96 godzin po zapłodnieniu i następnie zanikają. Tworzy się kilka olbrzymich jąder posiadających 45 i więcej jąderek. Obserwowano metafazę z 105 chromosomami, a przeciętna ich liczba w tej fazie podziałowej była 70. Rozwój mieszańcowego zarodka był względnie regularny w porównaniu z radykalnie zmienionym rozwojem towarzyszącej endospermy. Chociaż rozwija się on nieco wolniej aniżeli normalny zarodek, rośnie jednak i różnicuje się tak długo, dopóki istnieją choćby minimalne ślady endospermy. Zarodek nasion starszych może być wyizolowany i przeniesiony na pożywkę, gdzie może rozwijać się dalej. Tą drogą uzyskano mieszańca o 21 chromosomach. Był on pośredni pomiędzy formami rodzicielskimi, ale zupełnie bezpłodny (13).

Zapłodnienie zachodzi również w krzyżówce *H. sativum* ( $n = 7$ )  $\times$  *S. cereale* ( $n = 7$ ). Rozwój ziarniaka jest podobny do krzyżówki opisanej poprzednio. W endospermie tworzą się olbrzymie jądra i brak jest powstawania komórek. Jądra te dzielą się mitotycznie, ale przy braku wrzeczona podziałowego chromosomy zostają włączone w jedno rozrastające się jądro. Liczba chromosomów w takich jądach wynosi w przybliżeniu 175. Te olbrzymie jądra bardzo często można obserwować w ciętych preparatach poprzez 5 skrawków grubości 15 mikronów, a liczba jąderek waha się od 60 do 75 wskazując wysoką poliploidalność. Zarodek rozwija się i różnicuje do momentu, kiedy zostaje wykorzystana cała endosperma. Brak jest tu tworzenia się i zanikania tkanki między endospermą i wiązkami naczyniowymi. W konsekwencji nie ma w tym miejscu podziałów mitotycznych, podczas gdy w normalnie rozwijającym się ziarnie są tam bardzo czynne proliferacje komórek, które zanikają pod wpływem absorbcyjnej części endospermy.

Przy krzyżówce zwrotnej (reciprocal) zapłodnienie zachodzi, ale endosperma rozwija się jeszcze wolniej. Co prawda staje się ona wielokomórkowa, ale tylko są ślady lub brak w ogóle magazynowania materiałów zapasowych. Zarodek rozwija się wolno i zamiera po 6—7 dniach.

W wyniku tych 2 krzyżówek zarodek osiąga stadium rozwojowe, przy którym jest możliwe przeniesienie go na właściwą pożywkę i uzyskanie mieszańca (13). Ponieważ czynnikiem decydującym o nienormalnym rozwoju jest tu endosperma, a nie zarodek, można wyciągnąć wniosek, że endosperma jest barierą utrudniającą krzyżowanie tych dwóch gatunków.

### Wnioski ogólne i praktyczne

Przy próbach krzyżowania międzygatunkowego czy międzyrodzajowego bardzo często zachodzi normalne podwójne zapłodnienie. Zarodek mieszańcowy, mimo że opóźniony w rozwoju, nie wykazuje fatalnych skutków heterogeniczności, będącej wynikiem niezgodności genetycznej komponentów rodzicielskich. Brak w każdym razie dowodów, że nie-normalny rozwój zarodka sam w sobie jest przyczyną zamierania nasion. Jest on zwykle jeszcze bardzo mały, często tuż po stadium zygoty, kiedy w rozwijającym się nasieniu mieszańcowym zachodzą inne zmiany, określające dalszy jego rozwój.

W tym czasie endosperma jest już więcej zaawansowana w rozwoju, co skłania do przypuszczenia, że ona jest właśnie tkanką kontrolującą rozwój nasienia. Oczywiście w późniejszym okresie zarodek może stać się tkanką dominującą w nasieniu, ale zamieranie nasion mieszańcowych, chociaż często opóźnione, spowodowane jest zaburzeniami we wczesnych stadiach rozwojowych, tuż po zapyleniu.

Od czasu wykrycia podwójnego zapłodnienia i prób wyjaśnienia w tym świetle *Xenii* u kukurydzy (53), wydawało się, że endosperma posiada swoistą autonomię genetyczną. *Xenia* występuje jednak tylko w dojrzałym bielmie i to w ziarnach jednej z niewielu rodzin *Angiospermae*, gdzie tkanka ta pozostaje w dojrzałym ziarnie. Nie wyjaśnia to więc, w jakim zakresie wczesne zachowanie się endospermy jest kontrolowane genetycznie w znacznie większej liczbie gatunków, u których tkanka ta jest obecna tylko w młodych nasionach, a następnie zanika. Z wielu badań embriologicznych tego okresu wynikało, że raczej nie doceniano roli endospermy jako ważnego czynnika we wczesnych stadiach rozwoju nasienia. Trudno jeszcze i dzisiaj określić bliżej kontrolującą rolę czynnika genetycznego w rozwoju endospermy, niemniej szereg wyników uzyskanych w krzyżówkach form oddalonych wskazuje, że różnorodność genetyczna komponentów rodzicielskich w większym stopniu zakłóca rozwój endospermy, aniżeli zarodka. O działaniu czynnika genetycznego w rozwoju endospermy i przez nią nasienia świadczą pośrednio krzyżówki, w których nie jest obojętne, który gatunek jest zapylaczem, a który formą mateczną (7, 30, 46, 50). Krzyżowanie w jednym kierunku może nie dać efektu, natomiast odwrotnie doprowadzi do uzyskania pewnej ilości nasion mieszańcowych zdolnych do kiełkowania.

W świetle ostatnich badań należy dzisiaj podkreślić trzy fakty, które są konieczne dla zrozumienia mechanizmu zamierania nasion w krzyżówkach międzygatunkowych.

1. Endosperma odgrywa podstawową rolę w morfogenicznych zmianach prowadzących do przekształcenia zalążków w nasienie. Wynika to wyraźnie z badań nad mieszańcami w rodzaju *Nicotiana*.



2. Zachowanie się endospermy we wczesnych stadiach rozwojowych po zapłodnieniu zależy od jej struktury genetycznej. Ten fakt ustalono ilościowo na przykładzie *Medicago sativa*, gdzie stwierdzono istotną różnicę w szybkości podziałów jądrowych przy obcozapyleniu i chowie wsobnym. Potwierdziło to się również w krzyżówkach *Nicotiana rustica* × *Nicotiana glutinosa* i *Nicotiana tabacum*.

3. Zamieranie młodych nasion mieszańcowych jest wynikiem zmian w tkankach macierzystych zalążka, które pojawiają się jako rezultat niedorozwoju funkcjonalnego endospermy. Zwykle słabo rozwijającej się endospermie towarzyszą przerosty (*hyperplasia*) przyległych tkanek macierzystych, co stwarza często pozory zagłodzenia. Niemniej zmiany te przyspieszają zamieranie nasion. Ponieważ *hyperplasia* tkanek macierzystych stanowi główną przyczynę zamierania zarodków, określono ten typ zaburzeń jako *bezpłodność somatoplastyczną* (10).

Endosperma może więc stanowić jedną z barier, używając określenia Dobzhański'ego (27), nie krzyżowania się gatunków u *Angiospermae*. Tkanka endospermalna stanowi tu podstawę mechanizmu izolacji, która przeszkadza, podobnie jak liczne inne zaburzenia fizjologiczne, w wymianie genów między grupami gatunków.

Stwierdzenie natomiast, że zamieranie nasion mieszańcowych w związku z nienormalnym rozwojem endospermy nie oznacza bynajmniej nieżywotności zarodka, ma doniosłe znaczenie praktyczne. „Mechanizm letalności” nie znajduje się więc w samym rozwijającym się mieszańcu, ale przebiega równoległe do jego rozwoju i dotyczy krótkiego, ale krytycznego wycinka. Oswobodzenie zarodka z tego niekorzystnego środowiska przed jego zamarciem może przyczynić się do jego rozwoju w roślinę mieszańcową. Znamy już wiele przykładów bujnych roślin mieszańcowych, które rozwinęły się z niedorozwiniętych nasion. Nasiona te przeszły jednak ten krytyczny próg w rozwoju, umożliwiając ich skiełkowanie (na pożywkach). Badania te wykazują, że istnieje wiele zarodków krzyżówek form oddalonych, których realizacja potencjału mieszańcowego oczekuje na zastosowanie właściwej techniki sztucznych hodowli. Prace Laibach'a, Tukey, van Overbeek i innych (6, 35, 37, 47, 48) wskazują na możliwości uzyskania roślin mieszańcowych z zarodków izolowanych i prowadzonych na syntetycznych pożywkach.

Zakres, w jakim hodowcy roślin będą zdolni do wykorzystania możliwości krzyżówek form oddalonych, jest prawdopodobnie znacznie szerszy, aniżeli przypuszczano poprzednio. Wiele niepowodzeń w próbach hodowli izolowanych zarodków w pewnych gatunkach nie powinno zniechęcać badaczy. Realne możliwości wynikają choćby z uświadomienia sobie, że dojrzałą marchew udało się uzyskać z pojedynczej komórki phloemu (38). Stąd nie ma chyba przesadnego optymizmu wśród tych badaczy, którzy

twierdzą, że w sferze możliwości człowieka leży wyhodowanie roślin mieszańcowych z zarodków, których rozwój jest tuż poza stadium zygoty (proembryo).

Mieszańce takie mogą być w pełni bezpłodne, ale sprawa przywrócenia im płodności nie jest dzisiaj problemem, np. poprzez naturalne czy sztuczne tworzenie amfidiploidów. Istnieją jednak pewne prace, które wskazują, że bezpłodność mieszańców międzygatunkowych nie jest regułą. W tym zakresie ciekawe są krzyżówki w rodzaju *Melilotus* (54). Droga sztucznego krzyżowania nie udało się uzyskać mieszańca *M. alba* × *M. officinalis*. Po stwierdzeniu jednak, że zapłodnienie zachodzi i nasienie zamiera w kilku dni po zapyleniu, wyizolowano młody zarodek i poprzez hodowlę na pożywce uzyskano roślinę mieszańcową. Największą niespodzianką był jej normalny, bujny rozwój i zupełna płodność na poziomie diploidalnym. Potwierdza to jeszcze raz poprzednie wnioski, że izolacje międzygatunkowe dotyczą często małego wycinka rozwoju nasienia mieszańcowego, przewyciężenie którego daje żywotne i płodne rośliny mieszańcowe.

#### LITERATURA

1. Beaudry, J. R. 1951. Seed development following the mating *Elymus virginicus* L. × *Agropyron repens* (L.). *Beauv. Genetics* 36 : 109—133.
2. Bell, G. D. H., and Sachs, L. 1953. Investigations in the *Triticine*. II. The cytology and fertility of intergeneric and interspecific F<sub>1</sub> hybrids and their derived amphidiploids. *J. Agr. Sci.* 43 : 105—115.
3. Beamish, K. I. 1955. Seed failure following hybridization between the hexaploid *Solanum demissum* and four diploid *Solanum* species. *Am. J. Botany* 42 : 297—304.
4. Bhaduri, P. N. 1935. Studies on the female gametophyte in *Solanaceae*. *Jour. Ind. Bot. Soc.* 14 : 133—149.
5. Blakeslee, A. F. 1945. Removing some of the barriers to crossability in plants. *Proc. Am. Phil. Soc.* 89 : 561—574.
6. Blakeslee, A. F., and Satina, S. 1944. New hybrids from incompatible crosses in *Datura* through culture of excised embryos on malt media. *Science* 99 : 331—334.
7. Boyes, J. W., and Thompson, W. P. 1937. The development of the endosperm and embryo in reciprocal interspecific crosses in cereals. *J. Genet.* 34 : 203—227.
8. Briger, F., and Frorster, R. 1942. Tumores em certos hibridos do genero *Nicotiana*. *Bragantia* 2 : 249—274.
9. Brink, R. A., and Cooper, D. C. 1940. Double fertilization and development in the seeds of Angiosperms. *Bot. Gaz.* 102 : 1—25.
10. Brink, R. A., and Cooper, D. C. 1941. Incomplete seed failure as a result of somatoplastic sterility. *Genetics* 26 : 487—505.
11. Brink, R. A., and Cooper, D. C. 1943. Embryo viability and development of the seed following interspecific hybridization. *Rec. of the Gen. Soc. of Amer.* 12.

12. Brink, R. A., and Cooper, D. C. 1944. The antipodals in relation to abnormal endosperm behaviour in *Hordeum jubatum* × *Secale cereale* seeds. *Genetics* 29:391—406.
13. Brink, R. A., Cooper, D. C., and Ausherman, L. E. 1944. A hybrid between *Hordeum jubatum* and *Secale cereale* reared from an artificially cultivated embryo. *J. Heredity* 35:67—75.
14. Brink, R. A., and Cooper, D. C. 1947. The endosperm in seed development. *Bot. Rev.* 13:423—541.
15. Brink, R. A., and Cooper, D. C. 1947. Effect of the *de 17* allele on development of the Maize caryopsis. *Genetics*. 32:350—368.
16. Brock, R. D. 1955. Chromosome balance and endosperm failure in *Hyacinthus*. *Heredity* 9:199—222.
17. Buell, K. M. 1953. Development morphology in *Dianthus*. III. Seed failure following interspecific crosses. *Am. J. Botany* 40:116—123.
18. Cooper, D. C. 1941. Macrosporogenesis and the development of the seed of *Phryma leptostachya*. *Am. J. Botany* 28:755—761.
19. Cooper, D. C. 1949. Flower and seed development in *Oxybaphus nyctagineus*. *Am. J. Botany* 36:348—355.
20. Cooper, D. C. 1951. Caryopsis development following matings between diploid and tetraploid strains of *Zea mays*. *Am. J. Botany* 38:702—708.
21. Cooper, D. C., and Brink, R. A. 1940. Somatoplastic sterility as a cause of seed failure after interspecific hybridization. *Genetics* 25:593—617.
22. Cooper, D. S., and Brink, R. A. 1940. Partial self-incompatibility and the collapse of fertile ovules as factors affecting seed formation in alfalfa. *J. Agr. Research* 60:453—472.
23. Cooper, D. C., and Brink, R. A. 1944. Collapse of the seed following the mating of *Hordeum jubatum* × *Secale cereale*. *Genetics* 29:370—390.
24. Cooper, D. C., and Brink, R. A. 1945. Seed collapse following matings between diploid and tetraploid races of *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Genetics* 30:376—401.
25. Das, B. Ch. 1953. Cytological and embryological basis for sterility in autotetraploid sweetclover, *Melilotus alba* Desr. *Iowa State J. Sci.* 27:537—561.
26. Dnyansagar, V. R., and Copper, D. C. 1960. Development of the seed in *Solanum phureja*. *Am. J. Botany* 47:176—186.
27. Dobzhansky, T. 1951. *Genetics and the origin of species*. 3rd ed., 365 pp. Columbia Univ. Press, N. York.
28. Greenshields, J. E. R. 1954. Embryology of interspecific crosses in *Melilotus*. *Can. J. Botany* 32:447—465.
29. Hakansson, A. 1953. Endosperm development after 2x, 4x crosses in certain cereals, especially barley. *Hereditas* 39:57—64.
30. Hakansson, A. and Ellerström, S. 1950. Seed development after reciprocal crosses between diploid and tetraploid rye. *Hereditas* 36:256—296.
31. Jaranowski, J. 1961. Rozwój nasion w międzygatunkowych krzyżówkach nostrzyku (nie publikowane).
32. Jones, D. F. 1954. Gene and cytoplasm interaction in species separation. *Proc. 9th Intern. Congr. Genet. Part. II*, 1225—1227.
33. Kehr, A. E., and Smith, H. H. 1954. Genetic tumors in *Nicotiana* hybrids. Abnormal and pathological plant growth. *Brookhaven Symp. in Biol.* 6:55—78.
34. Kostoff, D. 1930. Ontogeny, genetics and cytology of *Nicotiana* hybrids. *Genetics* 12:33—39.

35. Laibach, F. 1925. Das Taubwerden von Bastardsamen und die künstliche Aufzucht früh absterbender Bastardembryonen. *Z. Botan.* 17:417—459.
36. Lee, J. H., and Cooper, D. C. 1958. Seed development following hybridization between diploid *Solanum* species from Mexico, Central South America. *Am. J. Botany* 45:104—110.
37. Mc Lean, S. W. 1946. Interspecific crosses involving *Datura ceratocaula* obtained by embryo dissection. *Am. J. Botany* 33:630—638.
38. Mitra, J., Marion, O., Mapes, and Steward, F. C. 1960. Growth and organized development of cultured cells. *Am. J. Botany* 47:357—368.
39. Rappaport, J., Satina, S., and Blakeslee, A. F. 1950. Extracts of ovular tumors and their inhibition of embryo growth in *Datura*. *Am. J. Botany* 37:586—594.
40. Sears, E. R. 1944. Inviability of intergeneric hybrids involving *Triticum monococcum* and *T. aegilopoides*. *Genetics* 29:113—127.
41. Satina, S., Rappaport, J., and Blakeslee, A. F. 1950. Ovular tumors connected with incompatible crosses in *Datura*. *Am. J. Botany* 37:576—585.
42. Stebbins, G. L. Jr. 1942. The role of isolation in the differentiation of plant species. *Biol. Symp.* 6:217—233.
43. Stebbins, G. R. Jr. and Pun, F. T. 1953. Artificial and natural hybrids in the *Gramineae*, tribe *Hordeae*. *Am. J. Botany* 40:444—449.
44. Stebbins, G. R. Jr. 1958. The inviability, weakness, and sterility of interspecific hybrids. *Advances in Genetics* 9:147—215.
45. Stokes, G. W. 1955. Seed development and failure in the horseradish. *J. Heredity* 46:15—21.
46. Thompson, W. P. 1930. Causes of difference in success of reciprocal interspecific crosses. *Am. Naturalist* 64:407—419.
47. Tukey, H. B. 1933. Artificial culture of sweet cherry embryos. *J. Hereditas* 24:1—12.
48. Van Overbeek, J. 1942. Cultivation *in vitro* of small *Datura* embryos. *Am. J. Botany* 29:427—477.
49. Walker, R. I. 1955. Cytological and embryological studies in *Solanum*, section *Tuberarium*. *Bull. Torrey Bot. Club.* 82:87—101.
50. Weaver, J. B. Jr. 1955. A study of embryo abortion in reciprocal interspecific crosses of *Gossypium*. Ph. D. Thesis, North Carolina State College.
51. Weaver, J. B. Jr. 1957. Embryological studies following interspecific crosses in *Gossypium* I. *G. hirsutum* × *G. arboreum*. *Am. J. Botany* 42:209—214.
52. Weber, W. W. 1949. Seed production in horseradish. *J. Heredity* 40:223—227.
53. Webber, H. J. 1900. *Xenia*, or the immediate effect of pollen in Maize. U. S. Dept. Agr. Bull. 22:1—44.
54. Webster, G. T. 1955. Interspecific hybridization of *Melilotus alba* × *Melilotus officinalis* using embryo culture. *J. Agronomy* 47:138—142.
55. Williams, E. J. 1955. Seed failure in the *Chippewa* variety of *Solanum tuberosum*. *Bot. Gaz.* 117:10—15.