

## **5. Analiza porównawcza struktury zalążka u *Sedum hispanicum* L. i *Sedum acre* L.**

Comparative analysis of the seed structure of *Sedum hispanicum* L. and *Sedum acre* L.

Jagiello Krzysztof<sup>(1,2)</sup>, Serbakowska Katarzyna<sup>(3)</sup>, Polonis Marcin<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Katedra Cytologii i Embriologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

<sup>(2)</sup> Zakład Biologii i Ekologii Morza, Wydział Oceanografii i Geografii, Uniwersytet Gdański

<sup>(3)</sup> Katedra Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

Opiekun naukowy: dr hab. Małgorzata Kozieradzka-Kiszkurno, prof. UG

Krzysztof Jagiello: krzjagiello@gmail.com

Słowa kluczowe: gruboszowate, embriogeneza, haustorium, suspensor.

### **Streszczenie**

Zalążki *Sedum hispanicum* i *S. acre* ze względu na budowę klasyfikuje się jako anatropowe. Rozwój zarodka przebiega według typu Caryophyllad - po podziale zygoty powstają dwie komórki, komórka bazalna, która nie ulega podziałom oraz komórka apikalna, z której powstaje cały zarodek właściwy i chalazalne komórki suspensora.

Przez cały okres rozwoju zalążka odżywianie zarodka przechodzi od stadium pobierania substancji odżywczych za pomocą suspensora do bezpośredniego poboru z bielma. Suspensor u *Sedum hispanicum* i *S. acre* składa się z komórki bazalnej i trzech komórek chalazalnych suspensora. Substancje odżywcze potrzebne dla rozwoju zarodka mogą być również pobierane przez haustoria – chalazalne i mikropylarne. Rozrastają się one przez tkanki zalążka czyli ośrodek i integument, ale również i chalazę, oraz sznureczek. Wewnątrz haustoriów oraz komórki bazalnej suspensora, w pobliżu ścian transferowych, występują bardzo liczne mitochondria, co wskazuje na uczestnictwo haustorium w aktywnym transporcie substancji.

Głównymi materiałami magazynowanymi w liścieniach lub bielmie nasion są: skrobia, białka i lipidy. Obserwacje mikroskopowe wskazują, że materiałem zapasowym magazynowanym w komórkach zarodka *Sedum hispanicum* są białka znajdujące się w wakuolach, a komórki *S. acre* zawierają lipidy, jako rezerwy odżywcze oraz skrobię w licznych ziarnach skrobiowych. Różnice w składzie materiału zapasowego tych roślin mogą wskazywać na przystosowanie do środowiska życia.

### **1. Wstęp**

Do badań wybrano gatunki z rodzaju *Sedum* należące do rodziny gruboszowatych (Crassulaceae). W rodzinie tej zalążki wytwarzają dwa rodzaje haustoriów: zarówno pochodzenia endospermowego jak i wytwarzane przez komórkę bazalną suspensora. Gruboszowate jest to rodzina roślin składająca się z około 1400-1500 gatunków roślin. Większość z nich to wieloletnie rośliny zielne i krzewy. Gatunki reprezentujące tę rodzinę są szeroko znanymi ozdobnymi roślinami (np. *Sempervivum marmoratum*) i roślinami leczniczymi jak np. *Rhodiola rosea* (Goncharova i Goncharov 2009). Crassulaceae jest rodziną kosmopolityczną występują zarówno w klimacie suchym jak i umiarkowanym. Nie stwierdzono ich występowania na kontynencie australijskim oraz antarktycznym. Crassulaceae to jedna z rodzin roślinnych, której reprezentanci wykazują metabolizm CAM. Jest to szlak metaboliczny typowy dla wczesnych roślin naczyniowych, lecz jest bardziej wydajny niż rodzaj metabolizmu C4 (Gontcharova i Gontcharov 2008).

Celem pracy jest analiza porównawcza struktury zalążka u dwóch gatunków z rodzaju *Sedum*: *S. acre* i *S. hispanicum* (Crassulaceae)

## 2. Materiały i metody

Do analizy porównawczej wybrano dwa gatunki roślin z rodziny *Crassulaceae* – *Sedum hispanicum* i *Sedum acre*. Kwiaty i niedojrzałe owoce pochodzą z naturalnych stanowisk Gdańska i okolic Gdyni.

Do badań ultrastrukturalnych załączki w różnych stadiach rozwoju utrwalono w 2,5% glutaraldehydzie i 2,5% formaldehydzie w 0.1M buforze kakodylowym (pH=7,0) przez 4 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie materiał płukano 4 razy po 15 minut w 0,05M buforze kakodylowym. Materiał przeniesiono do 2% czterotlenku osmu na 24 godziny, po czym płukano w 0,05M buforze kakodylowym i wodzie destylowanej. Następnie materiał kontrastowano w 1% octanie uranylu przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej (w ciemności). Płukano czterokrotnie w wodzie destylowanej, po czym materiał odwadniano w szeregu acetonowym. Odwodniony materiał zatapiało w żywicy epoksydowej typu Spurr.

Do mikroskopii świetlnej materiał krajano na półcienkie skrawki o grubości 1-2  $\mu\text{m}$  obejmujące cały przekrój zatopionego załączka. Materiał krajano nożami szklanymi za pomocą ultramikrotomu SORVALL MT 2B. Skrawki umieszczano na szkiełkach podstawowych w kropli destylowanej wody a następnie suszono w temperaturze 60 °C. Kontrolne skrawki barwiono błękitem toluidyny i oglądano pod mikroskopem świetlnym wybierając odpowiednie stadium załączka.

Skrawki ultracienkie o grubości 60-100 nm krajano diamentowym nożem przy użyciu ultramikrotomu SORVALL MT 2B. Ultracienkie skrawki barwiono octanem uranylu i cytrynianem ołowiu.

Przygotowane w ten sposób skrawki poddano analizie i fotografowaniu przy użyciu mikroskopu elektronowego PHILIPS CM 100.

## 3. Wyniki

Kwiaty roślin gruboszowatych są promieniste, zwykle pięciokrotne. Działki kielicha i płatki korony są zwykle wolne. Owocolistki tworzą słupkowie apokarpiczne, złożone z odrębnych lub częściowo zrosniętych słupków (Carrillo-Reyes i in. 2009).

Zalążek *Sedum hispanicum* oraz *S. acre* jest anatropowy i dwuosłonkowy. Zarodek rozwija się według typu Caryophyllad. Zygota ulega podziałowi na dwie różnej wielkości komórki. Sąsiadująca z mikropyle komórka bazalna jest większa od apikalnej i posiada duże jądro. Komórka bazalna nie ulega podziałowi, zwiększa swoje rozmiary i wytwarza haustorium, które wnika głęboko w tkanki załączka. Komórka apikalna ulega podziałom tworząc właściwy zarodek oraz chalazalną część wieszadełka. Bielmo obu badanych gatunków jest typu celularnego i wytwarza haustorium.

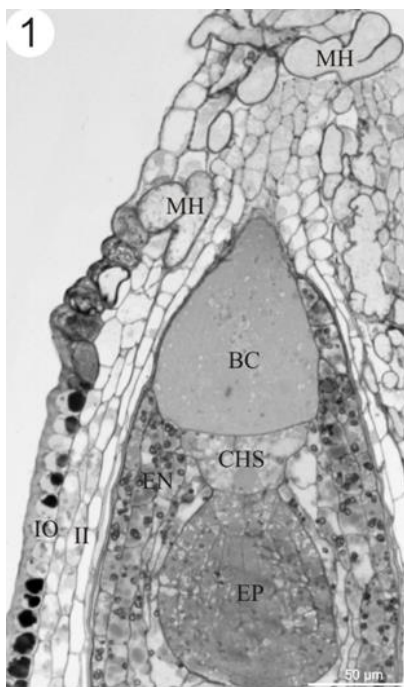
### I. *Sedum hispanicum* L.

#### Stadium prazarodka dwukomórkowego

Dwukomórkowy prazarodek tworzy: komórka bazalna o wielkości  $\sim 20 \times 48 \mu\text{m}$ , która znajduje się na mikropylarnym biegunie woreczka załączkowego oraz komórka apikalna o wielkości  $\sim 8 \times 12,5 \mu\text{m}$  po stronie chalazalnej. Na tym etapie rozwoju komórka bazalna wytwarza już jednokomórkowe bezjądrowe haustorium. Natomiast w chalazalnym rejonie woreczka załączkowego endosperma wytwarza jednokomórkowe jednojądrowe haustorium. Zalążek jest dwuosłonkowy. Osłonki są oddzielone od bielma warstwą kutykuli. Komórki integumentu wewnętrznego są podłużne i ułożone równolegle względem warstwy kutykuli. Komórki integumentu zewnętrznego w porównaniu z wewnętrznym są mniejsze i posiadają grubsze ściany komórkowe. W większości komórek integumentu zewnętrznego znajdują się duże wakuole, które gromadzą taniny. W komórkach osłonki zewnętrznej obserwujemy wyraźnie zaznaczone owalne jądra z centralnie ułożonymi elektronowo-gestymi jąderkami.



W cytoplazmie widoczne jest szorstkie retikulum endoplazmatyczne oraz niewielkie ilości mitochondriów i drobnych wakuol.



**Ryc. 1.** Stadium zarodka globularnego, CHS - chalazalne komórki suspensora, EN – endosperma, EP - zarodek właściwy, II – integument wewnętrzny, IO – integument zewnętrzny, MH – haustorium mikropylarne.

### Stadium zarodka globularnego

W porównaniu do poprzedniego stadium rozwoju suspensor jest tu już w pełni wykształcony. Zbudowany jest z dużej komórki bazalnej o gruszkowatym kształcie o rozmiarze ~ 74 x 96 μm oraz dwóch pięter komórek chalazalnych. Komórka bazalna wytwarza jednokomórkowe i bezjądrowe mikropylarne haustorium, które penetruje mikropylarną część zalążka. W niektórych zalążkach obserwowano haustorium wyrastające poza integument zewnętrzny. W tym stadium rozwoju bielmo jest już dobrze wykształcone, i posiada zmagazynowane substancje odżywcze w formie ziaren aleuronowych. Komórki integumentu wewnętrznego graniczą z endospermą. Pomiędzy nimi widoczna jest warstwa kutykuli. Kutykula nie występuje po mikropylarnej stronie suspensora.

W porównaniu z poprzednim stadium rozwoju w komórkach zewnętrznego integumentu na opisywanym etapie rozwoju widoczna jest zmniejszona ilość zmagazynowanych w wakuolach tanin. Zanotowano zwiększoną ilość profili szorstkiej siateczki śródplazmatycznej. W cytoplazmie zaobserwowano również duże jądro komórkowe z widocznym jąderkiem oraz mitochondria i drobne wakuole. W komórkach osłonki zewnętrznej nie zaobserwowano plastydów. Większość komórek integumentu wewnętrznego wypełniają duże, nieregularne wakuole a z organelli w cytoplazmie występują elipsoidalne plastydy z widocznymi tylakoidami oraz owalne mitochondria.

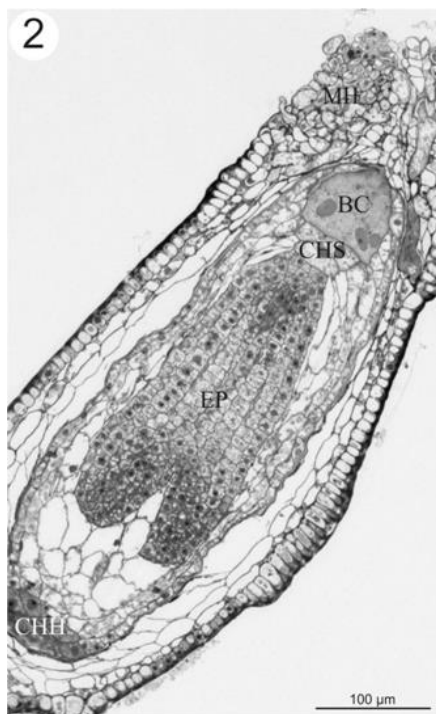
### Stadium zarodka sercowatego

W tym stadium rozwoju komórka bazalna nie powiększa się i osiąga wymiary 72,5 x 70 μm. Zarodek właściwy w stadium sercowatym wykazuje wyraźne różnice w składzie komórkowym na biegunach zalążka. Regiony chalazalne i mikropylarne barwią się błękitem toluidyny ciemniej. Jest to spowodowane nagromadzeniem większej ilości ciał białkowych w tych komórkach. Komórki peryferyczne zarodka posiadają mocno wybarwione jądra komórkowe. Komórki wewnątrz zarodka właściwego są ułożone regularnie. Wewnątrz komórek zarodka jest dużo wakuol z czego w niektórych są magazynowane ciała białkowe.

W peryferycznej części bielma obserwowano komórki posiadające wyraźne amyloplasty.

Komórki integumentu zewnętrznego mają grubsze ściany niż wewnętrznego ale na tym etapie rozwoju właściwie już nie posiadają zmagazynowanych w wakuolach.

W niektórych zalążkach na tym etapie rozwoju mikropylarne haustorium wyraźnie wyrasta poza zalążek. Cytoplazma haustorium jest elektronowogęsta i zawiera dużą ilość wyrostków transferowych skierowanych do wnętrza cytoplazmy. Pomiedzy wyrostkami transferowymi zanotowano obecność dużej ilości mitochondriów. Na chalazanym biegunie zalążka zaobserwowano degenerujące, ciemno-wybarwione haustorium chalazalne wytworzone przez endospermę.



**Ryc.2.** Stadium zarodka sercowatego,  
BC - komórka bazalna,  
CHH - haustorium chalazalne,  
CHS - chalazalne komórki suspensora,  
EP - zarodek właściwy,  
MH – haustorium mikropylarne

## II. *Sedum acre* L.

Ze względu na podobieństwa w rozwoju i strukturze obu badanych gatunków poniżej uwzględniono stadium rozwoju zarodka, gdzie zaobserwowano istotne różnice.

### Stadium zarodka globularnego

Zalążek jest dwuosłonkowy a komórki zewnętrznego integumentu pozbawione są tanin. Zaobserwowane haustorium mikropylarne nie ogranicza swojego rozwoju tylko do strony mikropylarnej zalążka ale także rozprzestrzenia się w kierunku chalazalnego bieguna zalążka. Komórki zarodka nie zawierają ciał białkowych, natomiast posiadają nieliczne ciała lipidowe oraz bardzo liczne ziarna skrobi.

Cytoplazma komórki bazalnej jest bogata w mitochondria, diktiosomy oraz profile szorstkiego retikulum endoplazmatycznego oraz zawiera niewiele wakuol.

W komórkach haustorium przy wyrostkach ściany transferowej obserwuje się dużą ilość mitochondriów o wydłużonym kształcie, oraz elipsoidalnych plastydów ze słabo rozwiniętym systemem błon wewnętrznych.



#### 4. Dyskusja

Rośliny okrytozalążkowe, jako grupa, udoskonaliły struktury wyspecjalizowane do reprodukcji, takie jak kwiat, którego jedną z głównych funkcji jest produkcja gamet. Komórka jajowa formuje się wewnątrz gametofitu żeńskiego, który znajduje się w zalążku. Następnym etapem zapylenia jest przemiana zalążka w nasiono (Raghavan 1986).

Nasiona roślin okrytozalążkowych są złożone z dwóch produktów zapłodnienia – zarodka i bielma, otoczonych przez łuskę nasienną wytworzoną przez roślinę macierzystą. Udana interakcja tych trzech komponentów jest wymogiem, by nasiona ukończyły swój rozwój i wytworzyły prawidłowy zarodek, który jest w stanie ustanowić nową generację sporofitu (Lafon-Placette i Köhler 2014).

Jako początek powstawania nasion uznaje się powstanie zygoty podczas zapłodnienia. Z niej rozwija się wielokomórkowy zarodek, którego komórki, specjalizując się budują nowy organizm (Kozieradzka-Kiszkurno 2011). Zalążki *S. hispanicum* oraz *S. acre* wykazują typ rozwoju Polygonum. Dojrzały zarodek roślin Angiospermae ma zazwyczaj dość prostą budowę. U Dicotyledones składa się z osi hipokotylowo-korzeniowej oraz dwóch liścieni, w których są magazynowane substancje odżywcze. Wzrost rośliny w tym etapie zapewniają dwa merystemy: wierzchołkowy pędu i korzenia (Rodkiewicz 1973).

Zalążki *S. hispanicum* oraz *S. acre* są anatropowe. Jest to najpospolitszy typ ułożenia zalążka względem osi zalążni występujący powszechnie zarówno u dwuliściennych, oraz jednoliściennych.

##### I. Zarodek

U *S. hispanicum* i *S. acre* zarodek właściwy rozwija się z komórki apikalnej. Wraz z rozwojem, zarodek właściwy zmienia swoją wielkość, kształt oraz molekularną zawartość komórek. Rodkiewicz (1973) wyróżnia kilka stadiów rozwojowych zarodka biorąc pod uwagę jedynie jego przeobrażenia morfologiczne; od stadium globularnego gdzie prazarodek ma średnicę ~20-80  $\mu\text{m}$ , stadium sercowate (zarodek ma długość ~80-250  $\mu\text{m}$ ), torpedy, podkowy, oraz zarodka dojrzałego. Zmiana kształtu zarodka wynika z nierównomiernego tempa podziałów w poszczególnych strefach. Komórki zarodka *Sedum hispanicum* i *S. acre* niezależnie od stadium rozwoju mają gęstą cytoplazmę, a wraz z upływem czasu – zwiększającą się ilość ciał magazynujących składniki odżywcze w komórkach.

Zarodek *Sedum hispanicum* i *S. acre* jest otoczony endospermą. We wczesnym stadium rozwoju jego mikropylarny fragment jest połączony z suspensorem (Schel i in. 1984; Opsahl-Ferstad i in. 1997) przez który najprawdopodobniej pobiera składniki odżywcze (Lee i Yeung 2010).

##### II. Bielmo

Bielmo jest odżywczą tkanką służącą jako wsparcie dla rozwoju i kiełkowania zarodka, który intensywnie się rozrasta. U roślin z woreczkiem zalążkowym typu Polygonum, Allium, Drusa i Adoxa jest triploidalna, podczas gdy w pozostałych typach woreczków zalążkowych ploidalność bielma waha się od  $2n$  do  $15n$  (Rodkiewicz i in. 1996). Jeśli bielmo rozwinię się nieprawidłowo doprowadzi to ostatecznie do zatrzymania rozwoju zarodka (Lee i Yeung 2010).

Wraz z przejściem od promieniowej do dwustronnej osi symetrii rozwoju zarodka (od zarodka globularnego do sercowatego) rozpoczyna on pobieranie składników odżywczych bezpośrednio z bielma drogą apoplastyczną (Lafon-Placette i Köhler 2014). W dalszych stadiach rozwoju następuje zużywanie materiału zapasowego komórek bielma. Gdy zarodek *Sedum hispanicum* osiąga stadium sercowate, tylko peryferyczne części bielma posiadają wyraźne amyloplasty, co może wskazywać na zabsorbowanie przez zarodek większości zmagazynowanych substancji.

U *Sedum hispanicum* jak i *S. acre* podczas podziału jądra komórkowego komórek bielma następuje również odkładanie nowej ściany komórkowej (brak komórek wielojądrowych), czyli bielmo jest typu cellularnego. Podobny typ rozwoju bielma można zaobserwować u *Trochodendron aralioides* i jest on charakterystyczny dla około 80 rodzin roślin

dwuliściennych (tj. Ranunculaceae, Umbelliferae, Rubiaceae) oraz 2 rodzin jednoliściennych (Araceae, Lemnaceae) (Rodkiewicz 1973).

### III. Materiały zapasowe

Głównymi materiałami magazynowanymi w liścieniach lub bielmie nasion są: skrobia, białka i lipidy. Ilość materiału przechowywanego w nasionach zmienia się wraz z wysokością ich siedlisk, jak zaobserwowano u *Glycine max* (Watanabe i Nagasawa 1990). Nasiona roślin rosnących na dużych wysokościach mogą wymagać do kiełkowania na początku następczej wiosny więcej wydajnego materiału, takiego jak lipidy z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi (Weng i Kuo-Huang 1998).

Materiałem zapasowym magazynowanym w komórkach zarodka *Sedum hispanicum* są białka znajdujące się w wakuolach. Białka zapasowe są pierwotnie deponowane w centralnej wakuoli, z której w późniejszym stadium odpączkowują mniejsze wakuole czyli przyszłe ciała białkowe (Johansson i Walles 1994). Komórki *S. acre* zawierają lipidy jako rezerwy odżywcze oraz skrobię w licznych ziarnach skrobiowych. Różnice w składzie materiału zapasowego tych roślin mogą wskazywać na przystosowanie do środowiska życia.

### IV. Integumenty

W trakcie rozwoju załążka, wokół woreczka załążkowego wyrasta jedna lub dwie osłonki (Sympetalae), a w wyjątkowych przypadkach osłonki w ogóle nie powstają (u Santalales). Osłonki są zbudowane z tkanki miękkiszowej. Ich komórki zawierają substancje zapasowe. Integumenty po zapyleniu przekształcają się w łupinę nasienną, która otacza zarodek (Rodkiewicz 1973).

Załączki *Sedum hispanicum* oraz *S. acre* są dwuosłonkowe. Komórki zewnętrznego integumentu obu gatunków składają się z komórek podobnych kształtem, ale nie składem wnętrza. Większość komórek osłonki zewnętrznej *Sedum hispanicum* zawiera wakuole gromadzące taniny, czego nie obserwujemy u *S. acre*. Pierwotnie duże ilości zmagazynowanego materiału z upływem czasu zmniejszają się wskazując na jego zużycie. W komórkach integumentu zewnętrznego *Sedum hispanicum* zwiększa się ilość profili szorstkiej siateczki śródplazmatycznej można podejrzewać zwiększoną produkcję białek w tych komórkach.

Integument wewnętrzny obu porównywanych gatunków ma komórki w dużej mierze zwakuolizowane, zawierające plastydy z wyraźnymi tylakoidami oraz mitochondria.

### V. Suspensor

Charakterystyczną cechą embriogenezy wielu roślin okrytozałążkowych jest zróżnicowanie zarodka na dwie części już we wczesnym stadium rozwoju. W jednej z nich zachodzi organogeneza (zarodek właściwy), a druga odróżnicowuje w wieszadełko – organ krótkotrwały, który zanika przed wytworzeniem dojrzałego nasienia (Maheshwari 1950). Suspensor wykazuje ważną rolę w trakcie wczesnego rozwoju zarodka aktywnie uczestnicząc w absorpcji składników odżywczych z otaczających tkanek, ich transportu do zarodka (Lee i Yeung 2010), oraz produkcji hormonów wzrostu (Raghavan 1986; Yeung i Meinke 1993).

Jego morfologia u roślin Angiospermae jest bardzo różnorodna. Wieszadełko *Sedum hispanicum*, *S. acre* tak samo jak *Vicia faba* (Johansson i Walles 1994) zawiera kilka komórek, podczas gdy u *Phaius tankervilleae* zawiera jedną, wysoko zwakuolizowaną komórkę (Lee i Yeung, 2010), a u *Phaseolus coccines* składa się z setek komórek (Yeung i Clutter 1979). Absorpcja składników odżywczych przez suspensor jest ułatwiona dzięki występowaniu wzrostów ściennych typowych dla komórek transferowych (Gunning i Pate 1969).

U *S. acre* transport substancji odżywczych przez suspensor jest transportem aktywnym, na co może wskazywać duża ilość mitochondriów w cytoplazmie komórki bazalnej.

Wraz z rozwojem załążka wieszadełko przestaje spełniać swoje funkcje i ulega programowanej śmierci komórkowej. U większości Angiospermae degeneracja suspensora rozpoczyna się, gdy zarodek właściwy osiąga stadium sercowate i rozpoczyna pobieranie składników odżywczych z komórek bielma (Yeung i in. 2006).



Kutykula otaczająca woreczek zalążkowy prawdopodobnie ogranicza dostarczanie metabolitów do woreczka zalążkowego (Jakobsen i in. 1994) dlatego nie występuje od strony mikropylarnej suspensora ani u *Sedum hispanicum* ani u *S. acre*.

## VI. Haustoria

Bielmo oraz suspensor u wielu gatunków wytwarza przypominającą strzępkę grzyba komórkę, która pobiera i transportuje syntetyzowane składniki odżywcze z różnych części zalążka i rośliny do zarodka (Rodkiewicz 1973). Haustorium chalazalne endospory jest uważane za drogę pobierania składników odżywczych z osłonek u *Glycine max* (Jakobsen i in. 1994). Za pomocą haustorium rośliny pasożytnicze (parazytofilne) przytwierdzają się do innej rośliny, oraz pobierają składniki pokarmowe od gospodarza (Acyord i Graves 1997). Wraz z rozwojem haustorium chalazalne u *Sedum hispanicum* degeneruje. Widać to już w stadium zarodka sercowatego.

Haustorium mikropylarne *Sedum hispanicum* oraz *S. acre* wraz z rozwojem powiększa swoje rozmiary wyrastając poza komórki zalążka. Umożliwia to pobieranie substancji odżywczych z innych części rośliny. Haustorium mikropylarne *Sedum acre* jest już w pełni rozwinięte w dwukomórkowym stadium prazarodka i rozprzestrzenia się w kierunku chalazalnego bieguna, w momencie, gdy u *S. hispanicum* ogranicza swój rozwój tylko do strony mikropylarnej.

Wewnątrz haustoriów, w pobliżu wyrostków ścian, które są charakterystyczne dla komórek transferowych, występują bardzo liczne mitochondria. Wskazuje to na uczestnictwo haustorium w aktywnym transporcie substancji, który wymaga energii.

## 5. Literatura

- Acyord RD, Graves JD (1997) The regulation of the water potential gradient in the host and parasite relationship between *Sorghum bicolor* and *Striga hermonthica*. *Annals of Botany*. 80: 649-656.
- Goncharova SB, Goncharov AA (2009) Molecular phylogeny and systematics of flowering plants of the family Crassulaceae. *Molecular Biology (Mosk)* 43(5):856-865.
- Gunning BES, Pate JS (1969) "Transfer cells" – plant cells with wall ingrowths specialized in relation to short distance transport of solutes – their occurrence structure, and development. *Protoplasma* 68: 107-133.
- Jakobsen HB, Martens H, Lyshede OB (1994) Accumulation of Metabolites during Seed Development in *Trifolium repens* L. *Annals of Botany* 74: 409-415.
- Johansson M, Walles B (1994) Functional anatomy of the Ovule in Broad Bean (*Vicia faba* L.): Ultrastructural Seed Development and Nutrient Pathways. *Annals of Botany* 74: 233-244.
- Kozieradzka-Kiskurno M (2011) Do czego roślinie potrzebne jest wieszadełko?. *Kosmos* 60: 153-160.
- Lafon-Placette C, Köhler C (2014) Embryo and endospem, partners in seed development. *Current Opinion in Plant Biology* 17: 64-69.
- Lee YI, Yeung EC (2010) The osmotic property and fluorescent tracer movement of developing orchid embryos of *Phaius tankervilleae* (Aiton) Bl. *Sexual Plant Reproduction* 23: 337-341.
- Maheshwari P (1950) An introduction to the embryology of the Angiosperms. McGraw-Hill, New York, Toronto, London.
- Opsahl-Ferstad HG, Le Deunff E, Dumas C et al. (1997) ZmEsr, a novel endosperm-specific gene expressed in a restricted region around the maize embryo. *Plant Journal* 12: 235-246.
- Raghavan V (1986) Embryogenesis in Angiosperms: A Developmental and Experimental Study. Press Syndicate of the University of Cambridge. New York.
- Rodkiewicz B (1973) Embriologia Roślin Kwiatowych. PWN, Warszawa.
- Rodkiewicz B, Śnieżko R, Fyk B i in. (1996) Embriologia Angiospermae rozwojowa i eksperymentalna. Wydawnictwo UMCS, Lublin.

- Schel JH, Kieft NH, Van Lammeren A, (1984) Interaction between embryo and endosperm during early developmental stages of maize caryopses (*Zea mays*). Canadian Journal of Botany 62: 2842–2853.
- Watanabe I, Nagasawa T (1990) Appearance and chemical composition of soybean seeds in germplasm collection of Japan. Japanese Journal of Crop Science 59:649–660.
- Weng M., Kuo-Huang L (1998) Comparative Anatomy and Histochemical Study of the Seeds of *Sedum formosanum* N. E. Br. and *Sedum morrisonense* Hayata. Taiwania 43(4): 307-315.
- Yeung EC, Meinke DW (1993) Embryogenesis in angiosperms: development of the suspensor. The Plant Cell 5: 1371-1381.
- Yeung EC, Zee XY, Ye XL (2006) Suspensor functions. W: Batygina T.B., (red.) Seed. Embryology of flowering plants, vol 2. New Hampshire: Science Publishers, 208-212