

## 1. Streszczenie

Wzrastająca w skali globalnej produkcja towarowa *Rubus idaeus* gwarantuje zapylaczom ciągłą dostępność nektaru i pyłku od maja do sierpnia. Struktura nektarników ma kluczowe znaczenie dla wyjaśnienia mechanizmów warunkujących dynamikę produkcji i właściwości nektaru oraz stanowi wskazówkę w określeniu ekologicznych i filogenetycznych relacji pokrewnych taksonów. Także cechy palinologiczne pyłku stanowią deskryptory w opracowaniu identyfikacji komputerowej ziaren. Celem pracy było określenie struktury nektarników kwiatowych i ziaren pyłku oraz sekrecji nektaru i produkcji pyłku, a także ich wybranych składników sześciu odmian *R. idaeus*.

Badania przeprowadzone w latach 2016 - 2018 obejmowały sześć odmian *Rubus idaeus*: 'Glen Ample', 'Laszka', 'Radziejowa', 'Polka', 'Polana' i 'Pokusa'. Strukturę nektarników i ziaren pyłku analizowano wykorzystując mikroskopię: świetlną, fluorescencyjną oraz skaningową i transmisyjną elektronową. Określono obfitość nektarowania i produkcję pyłku. Jakościowy i ilościowy skład cukrów w nektarze porównano wykorzystując wysokosprawną chromatografię cieczową. Zawartość białka ogólnego w nektarze i pyłku analizowano na podstawie ilości azotu oznaczonego metodą Kjeldahla. Profil aminokwasów oznaczono metodą chromatografii jonowymiennej. Zawartość tłuszczu ogółem w pyłku porównano metodą Soxhleta, skład ilościowy i jakościowy kwasów tłuszczowych wykonano stosując chromatografię gazową. Mikroanalizę pierwiastków w pyłku przeprowadzono przy użyciu energodispersyjnej analizy rentgenowskiej.

Nektarniki badanych odmian *R. idaeus* należą do receptakularnych. Na powierzchni komórek epidermy nektarnika prążki były ułożone w pasma, najwęższe u 'Pokusa', a najszersze z największym obszarem międzypasmowym u 'Polana'. Większą liczbę aparatów szparkowych w epidermie nektarnika oraz bardziej rozbudowany kompleks szparkowy odnotowano u odmian owocujących na pędach dwuletnich niż powtarzających owocowanie. Na podstawie analizy skupień mikromorfologicznych cech epidermy wyróżniono jeden klaster dla 'Radziejowa' o charakterze odstającym, a w obrębie drugiego największe podobieństwo wykazują 'Pokusa' i 'Polka' oraz 'Glen Ample' i 'Polana'. W strukturze anatomicznej nektarników badanych odmian wykazano różnice w średnicy komórek i grubości warstw parenchymy nektarnikowej oraz podnektarnikowej. W ultrastrukturze komórek nektarników obserwowano: gęstą cytoplazmę i zrąb chromatynowy jądra, liczne amyloplasty, mitochondria, aparaty Golgiego oraz okołojądrowe i korowe ER. Współdziałanie tych struktur wpływa na proces sekrecji i świadczy

o wysokiej aktywności metabolicznej. Z kolei fuzja pęcherzyków transportujących z plazmolemą wskazuje na granulokrynową sekrecję i symplastyczny transport nektaru wspomagany apoplastycznie. Obfitą sekrecją nektaru o wysokim stężeniu (34,6 - 47,3%) i masie cukrów (6,9 'Polka' - 12,2 mg/kwiat 'Glen Ample') umożliwia rozbudowana struktura nektarnika. Nektar z dominującymi heksozami zawierał głównie glukozę i fruktozę oraz niewielkie stężenie sacharozy wyłącznie u 'Glen Ample' i 'Polka'. Produktywność wskazuje na dobre źródło pożytku nektarowego dla owadów. Nektar 'Pokusa' i 'Polka' charakteryzuje się znacznie wyższą zawartością białka ogólnego niż pozostałe odmiany. W grupie aminokwasów endogennych dominowały: kwas asparaginowy, kwas glutaminowy i prolina, a w egzogennych: lizyna, leucyna i treonina. Wymienione składniki pokarmowe mogą wpływać na jakość nektaru i preferencje zapylaczy.

Ziarna pyłku badanych odmian *R. idaeus* zaliczono do małych o kształcie *prolato-spheroides*. W skulpturze egzyny obserwowano prążki ułożone obok siebie, niekiedy dichotomicznie rozgałęzione u 'Glen Ample', 'Polka' i 'Polana', łukowato wygięte u 'Laszka' i 'Pokusa' lub nieregularnie rozmieszczone u 'Radziejowa'. Najszersze prążki oraz największą odległość pomiędzy nimi stwierdzono u 'Glen Ample', a najdrobniejsze z największym zagęszczeniem u 'Polka'. Liczba perforacji w egzynie pyłku na powierzchni  $10 \mu\text{m}^2$  wahała się w granicach od 39 ('Pokusa') do 92 ('Radziejowa'). Spośród badanych odmian ektoegzyna ziaren pyłku 'Glen Ample' charakteryzowała się najgrubszym tektum (431 nm) oraz warstwą podstawową (148 nm) i najrzadziej rozmieszczonymi kolumellami (407 nm). Mikromorfologiczne i ultrastrukturalne cechy pyłku mogą stanowić pomocnicze znaki w identyfikacji spokrewnionych taksonów z rodzaju *Rubus*. Uwzględniając masę pyłku (22,5 - 35,7 mg/10 kwiatów) badane odmiany uszeregowano następująco: 'Pokusa' < 'Polana' < 'Glen Ample' < 'Polka' < 'Radziejowa' < 'Laszka'. Produkcja pyłku oraz zawartość: białka ogólnego, aminokwasów egzogennych (leucyna, lizyna i walina) i endogennych (kwas asparaginowy, kwas glutaminowy i prolina), proporcje kwasów tłuszczowych i skład pierwiastkowy wskazują na dobrą jakość ziaren oraz wpływają na wartość odżywczą zwiększającą preferencję pyłku oraz atrakcyjność kwiatów dla owadów.

**Słowa kluczowe:** mikromorfologia, anatomia, ultrastruktura, epiderma, aparaty szparkowe, kutykula, egzyna, intyna, cukry, białka, aminokwasy, kwasy tłuszczowe, malina właściwa, Rosaceae, SEM, TEM.

## 8. Abstract

The globally increasing commercial production of *R. idaeus* guarantees pollinators continuous availability of nectar and pollen from May to September. The structure of nectaries is highly important for elucidation of the mechanisms determining the dynamics of production and properties of nectar and is an indicator in the determination of organic and phylogenetic relationships between related taxa. Similarly, the palynological features of pollen have been used as descriptors in the computer-assisted identification of pollen grains. The aim of the study was to determine the structure of floral nectaries and pollen grains as well as nectar secretion and pollen production with selected components of pollen in six *R. idaeus* cultivars.

The research was carried out in 2016-2018 covered six *R. idaeus* cultivars: 'Glen Ample', 'Laszka', 'Radziejowa', 'Polka', 'Polana', and 'Pokusa'. The structure of nectaries and pollen grains was analyzed using light, fluorescence, and scanning and transmission microscopy techniques. The nectar abundance and pollen production were determined. The qualitative and quantitative composition of nectar sugars was compared using high-performance liquid chromatography. The total protein content in the nectar and pollen was analyzed based on the nitrogen content determined with the Kjeldahl method. The amino acid profile was determined with the use of ion exchange chromatography. The total fat content in the pollen was compared with the Soxhlet method, and the quantitative and qualitative composition of fatty acids was determined using gas chromatography. The microanalysis of elements in the pollen was performed using energy dispersive X-ray analysis.

The nectaries of the studied *R. idaeus* cultivars represent the receptacular type. The surface of the nectary epidermis exhibited striae forming bands: the narrowest in 'Pokusa' and the widest bands with the largest inter-band spaces in 'Polana'. A higher number of stomata in the nectary epidermis and a more extensive stomatal complex were noted in the biennial cultivars than in the repeated-fruiting plants. The cluster analysis of the micromorphological features of the epidermis revealed one outlier cluster for 'Radziejowa' and another cluster with the greatest similarities exhibited by 'Pokusa' and 'Polka' as well as 'Glen Ample' and 'Polana'. The anatomical structure of the nectaries exhibited difference between the cultivars in the cell diameter and thickness of the nectary and subnectary parenchyma layers. The ultrastructure of the nectary cells exhibited the presence of dense cytoplasm, nucleus chromatin stroma, numerous amyloplasts, mitochondria, Golgi apparatus, and perinuclear and cortical ER. The cooperation between these structures had an impact on the secretion process and proved high metabolic

activity. In turn, the fusion of transport vesicles with the plasmalemma indicated granulocrine secretion and symplastic nectar transport supported via the apoplastic route. The abundant nectar production with high concentrations (35 'Polka' – 47% 'Glen Ample') and mass (6.9 'Polka' - 12.2 mg/flower 'Glen Ample') of sugars was facilitated by the well-developed structure of the nectary. The hexose-dominated nectar contained mainly glucose and fructose and low concentrations of sucrose exclusively in 'Glen Ample' and 'Polka'. This productivity indicates a good source of nectar for insects. The nectar of 'Pokusa' and 'Polka' had substantially higher content of total protein than the other cultivars. The endogenous protein amino acids were dominated by aspartic acid, glutamic acid, and proline, whereas lysine, leucine, and threonine were the dominant exogenous amino acids. These nutrients exert an effect on nectar quality and pollinator preferences

The pollen grains in the analyzed *R. idaeus* cultivars were classified as small grains with a *prolato-spheroides* shape. The exine sculpture exhibited parallel striae, sometimes branched dichotomously in 'Glen Ample', 'Polka', and 'Polana', arcuate in 'Laszka' and 'Pokusa', or arranged irregularly in 'Radziejowa'. The widest striae and the greatest distance between the striae were visible in 'Glen Ample', while the smallest and most densely arranged striae were observed in 'Polka'. The number of perforations per 10  $\mu\text{m}^2$  surface of pollen exine ranged from 39 ('Pokusa') to 95 ('Radziejowa'). The thickest tectum (431 nm) and foot layer (148 nm) and the least dense arrangement of columellae (407 nm) were found in the 'Glen Ample' pollen. The micromorphological and ultrastructural pollen traits may be helpful indicators for identification of related taxa of the genus *Rubus*. In terms of the pollen weight (22.5-35.7 mg/10 flowers), the cultivars were ranked as follows: 'Pokusa' < 'Polana' < 'Glen Ample' < 'Polka' < 'Radziejowa' < 'Laszka'. The production of pollen and the content of total protein, exogenous (leucine, lysine, and valine) and endogenous (aspartic acid, glutamic acid, and proline) amino acids, proportions of fatty acids, and elemental composition indicate good quality of the pollen grains and contribute to their enhanced nutritional value, thereby increasing pollen preference and the attractiveness of the flowers to insects.

**Keywords:** micromorphology, anatomy, ultrastructure, epidermis, stomata, cuticle, exine, intine, sugars, proteins, amino acids, fatty acids, raspberry, Rosaceae, SEM, TEM.