



Tracheogeneza w tkance kalusowej *Plantago asiatica* L.

Emilia Andrzejewska-Golec¹, Joanna Makowczyńska¹,
Krystyna Marek²

¹Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny,
Łódź

²Zakład Mikroskopii Elektronowej, Uniwersytet Medyczny, Łódź

Tracheogenesis in callus tissue of *Plantago asiatica* L.

Summary

Xylogenesis was observed in the morphogenic and nonmorphogenic calluses. The light microscopy was used for a histological study. The ultrastructure of the calluses was analysed using the JEM 100 B transmission electron microscope. Tracheary elements were formed in all studied kinds of calluses. They had lignified spiral or reticulate thickening of cell walls. In nonmorphogenic calluses, tracheary elements were chaotically dispersed. In morphogenic callus, the vessel system during caulo- and rhizogenesis from tracheary elements was formed. The application of TEM allowed for an observation of the very early stages of formation of tracheary elements which were initiated by the degeneration of cell protoplast and transformation of cell wall. Tracheogenesis has been already studied in callus culture. However, rarely the authors were concerned on the phenomenon of the ultrastructure level.

Key words:

tracheary elements, callus cultures, callus ultrastructure, *Plantago asiatica*.

Adres do korespondencji

Emilia
Andrzejewska-Golec,
Zakład Biologii i Botaniki
Farmaceutycznej,
Uniwersytet Medyczny,
ul. Muszyńskiego 1,
90-151 Łódź;
e-mail:
e.andrzejewska@wp.pl

1. Wprowadzenie

Plantago asiatica L. (*P. major* var. *asiatica*), babka azjatycka, asiatic plantain, ôbako – to takson rodziny Plantaginaceae, nieznan w Europie, natomiast na Dalekim Wschodzie uważany za bardzo cenny gatunek leczniczy. Jest on rośliną macierzystą surowców farmakopealnych w Japonii i Chinach. Ziele i nasiona dla celów leczniczych (a także na potrzeby przemysłu spożywczego

i kosmetycznego) pozyskuje się bądź ze stanu naturalnego, bądź z hodowli polowej (wyhodowano kilka kultuwarów).

Hodowlą *in vitro* tej rośliny zajął się po raz pierwszy Yisheng w 1996 r. (1), który zregenerował *P. asiatica* na drodze organogenezy pośredniej. Wyniki swoich badań opublikował jedynie po chińsku, stąd są mało dostępne, znane tylko z angielskiego streszczenia. Od kilku lat hodują babkę azjatycką *in vitro* Makowczyńska i Andrzejewska-Golec (2-7). Autorki w wyniku mikropropagacji uzyskiwały okazy *P. asiatica* o niezmienionej morfologii (5,7). Badały także organogenezę *in vitro* i somatyczną embriogenezę babki azjatyckiej (2,3,6). Wyhodowane kalusy poddawały analizie histologicznej i ultrastrukturalnej (4,6,8). Wiadomo, że bardzo charakterystycznym elementem budowy tkanki kalusowej są struktury trachealne, i im poświęcona jest ta praca.

2. Materiały i metody

Materiał do badań stanowiły kalusy morfo- i niemorfogenne *Plantago asiatica* L. Uzyskano je na eksplantatach (korzenie, liścienie, hipokotyle) pochodzących z siewek wyhodowanych *in vitro* stosując podłoże Murashige i Skooga (MS) wzbogacone 0,2 mg/dm³ kinetyny i 1 mg/dm³ GA₃. Nasiona sprowadzono z Tokio (Botanical Gardens, Faculty of Science, University of Tokyo i Metropolitan Medicinal Plant Garden). Hodowle prowadzono w fitotronie (28 ± 2°C, wilgotność powietrza 80-90%, oświetlenie 40 μM/m²s) na skosach agarowych.

Uzyskano dwie linie kalusa niemorfogenego: kremową (MS z dodatkiem 0,5 mg/dm³ 2,4-D i 0,2 mg/dm³ BAP) i zieloną (indukcja na podłożu MS wzbogaconym 0,1 mg/dm³ IAA i 2 mg/dm³ BAP; pasaż: MS z 0,5 mg/dm³ IAA i 0,2 mg/dm³ BAP). Poprzez wielokrotne pasaż (przesadzanie kalusa powtarzano co 3-4 tygodnie) uzyskano ustabilizowaną hodowlę tkanki kalusowej obu linii.

Podczas organogenezy pośredniej uzyskano kalusy:

- a) wyhodowany na podłożu 0,2 mg/dm³ IAA i 1 mg/dm³ BAP;
- b) indukowany na podłożu MS z 2 mg/dm³ NAA;
- c) indukowany na podłożu MS wzbogaconym 2 mg/dm³ IBA.

Kalusy poddawano systematycznym badaniom morfologicznym i histologicznym. Morfologię kalusa określano gołym okiem oraz za pomocą mikroskopu stereoskopowego. Powierzchnię wybranych kalusów różnego pochodzenia (eksplantaty pierwotne: liścień, hipokotyl, korzeń) zbadano także za pomocą mikroskopu skaningowego (SEM). W tym celu fragmenty kalusa utrwalano najpierw 3% aldehydem glutarowym w 0,2 M buforze fosforanowym o pH = 7,2 (utrwalacz redukcyjny) w temp. pokojowej w ciągu 24 godzin i następnie 2% czterotlenkiem osmu w buforze fosforanowym o pH = 7,2 (utrwalacz utleniający) 2-4 godz. również w temp. pokojowej, ale w ciemności. Z kolei badany materiał odwadniano stosując wzrastające stężenia alkoholu etylowego (70, 80, 90, 96% po 5-15 min oraz 100% 2 × po 15-30 min). Su-

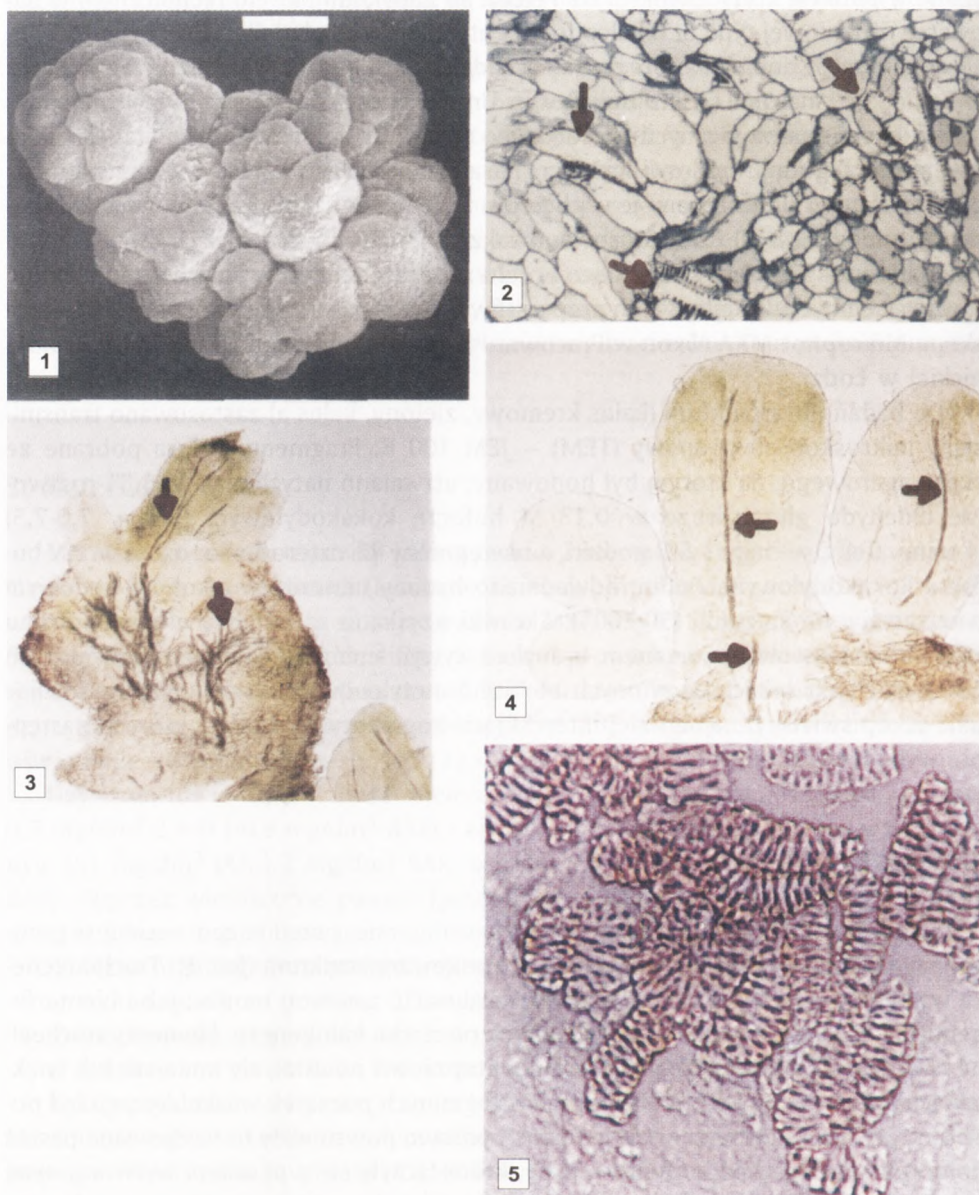
szone w punkcie krytycznym (CPD2 Pelco). Po napyleniu złotem technicznym w napyłarce próżniowej typu SC6 Pelco fragmenty kalusa oglądano w SEM (Tesla BS340), co dokumentowano mikrofotografiami. Badania w SEM przeprowadziła Jagna Karcz w Zakładzie Anatomii i Cytologii Roślin Uniwersytetu Śląskiego.

Do badań histologicznych sporządzano skrawki i preparaty rozgniatane z kalusów w 2-3 tygodniu hodowli każdego pasażu. Z każdego kalusa wykonywano ok. 20 preparatów. Umieszczano je w glicerolu z wodą i oglądano za pomocą mikroskopu świetlnego MB-30 PZO. Stosowano także 1% roztwór floroglucynolu w etanolu z dodatkiem 48% kwasu siarkowego w celu zabarwienia zdrewniałych ścian elementów trachealnych. Z najlepszych preparatów wykonywano zdjęcia za pomocą mikroskopu Mikrophot MXA-Nixon w Pracowni Patomorfologii Szpitala im. Marii Konopnickiej w Łodzi.

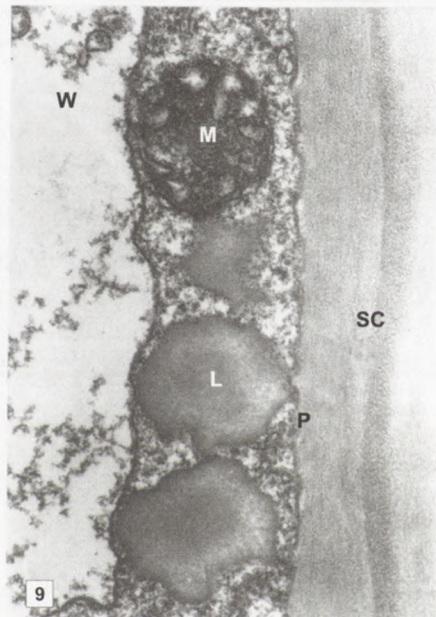
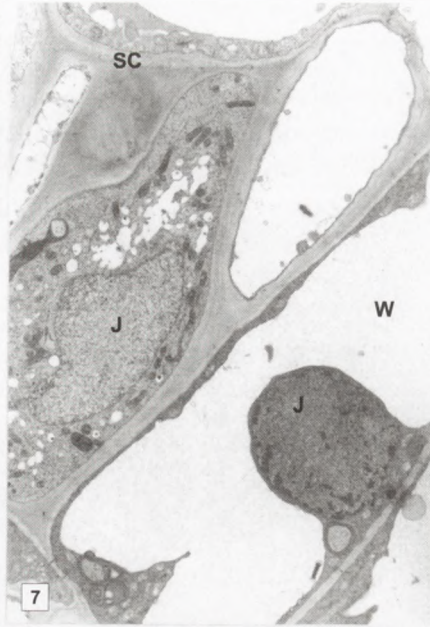
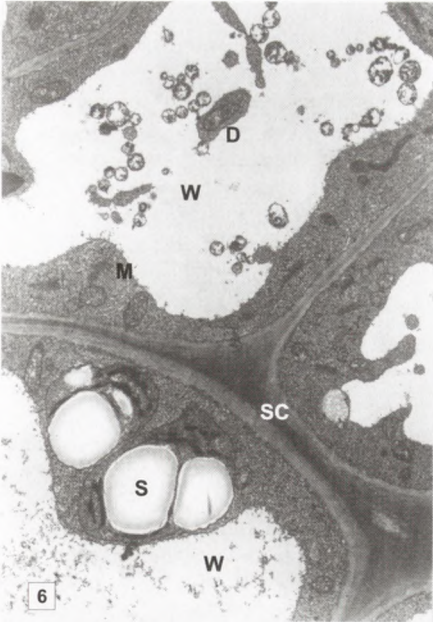
Do badań ultrastruktury (kalus kremowy, zielony, kalus a) zastosowano transmisyjny mikroskop elektronowy (TEM) – JEM 100 B. Fragmenty kalusa pobrane ze skosu agarowego, na którym był hodowany, utrwalano natychmiast w 3,5% roztworze aldehydu glutarowego w 0,13 M buforze kokakodylowym (pH = 7,0-7,5) w temp. 0-4°C w ciągu 1,5-2 godzin, a następnie w 1% czterotlenku osmu w 1 N buforze kokakodylowym. Potem odwadniano badany materiał w alkoholu etylowym o wzrastającym stężeniu (50-100%). Skrawki uzyskane za pomocą ultramikrotomu LKB III kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. W pomocniczych półcienkich skrawkach barwionych błękitem metylenowym wyszukiwano, stosując mikroskop świetlny, najbardziej interesujące fragmenty kalusów, z których następnie wykonywano mikrofotografie w TEM.

3. Wyniki

Kalusy niemorfogenne, a także kalusy morfogenne, przed rozpoczęciem organogenezy charakteryzowały się podobną gruzelkową strukturą (fot. 1). Tracheogeneza występowała we wszystkich badanych kalusach, zarówno morfo-, jak i niemorfogennych. Proces ten rozpoczynał się już na początku kalogenezy. Elementy trachealne tworzyły się pojedynczo, chaotycznie. Stopniowo powstawały mniejsze lub większe ich skupienia (fot. 2). W kalusach morfogennych początek waskularyzacji był podobny, jak w niemorfogennych, jednak stopniowo powstawały uszeregowane pasma komórek odpowiednio zorientowanych, które łączyły się z pasmami wytworzonymi w mikropędach lub w zawiązkach korzeni (fot. 3,4). Obserwowane przez nas elementy trachealne charakteryzowały się obecnością zgrubień wyłącznie helikalnych (spiralnych) i siatkowatych. O ich lignifikacji świadczy dodatnia reakcja z 1% floroglucynolem i 48% H₂SO₄ (fot. 5). Zastosowanie TEM pozwoliło na zapoznanie się z procesami transformacji komórki parenchymatycznej w element trachealny (fot. 6-13). Obserwowano zgrubienia blaszki środkowej (fot. 6,7), degenerację protoplastu (fot. 6-8) oraz wytwarzanie charakterystycznych zgrubień ściany komórkowej (fot. 9-13).



Fot. 1-5. *Plantago asiatica* L.- kalus. Fot. 1. Linia kremowa kalusa niemorfogenego – SEM, skala 500 μm (fot. J. Karcz). Fot. 2. Linia zielona kalusa niemorfogenego – skrawek półcienki, barwiony błękitem metylenowym, elementy trachealne (strzałka \uparrow), 300 \times . Fot. 3-4. Kaulogeneza kalusa morfogenego c, 7 tydzień pasaży 0 – elementy trachealne (strzałka \uparrow), fot. 3 – 75 \times , fot. 4 – 100 \times . Fot. 5. Kalus morfogeny b, 7 tydzień pasaży 0 – siatkowate elementy trachealne zabarwione 1% etanolem roztworem floroglucynolu i 48% kwasem siarkowym, 600 \times .

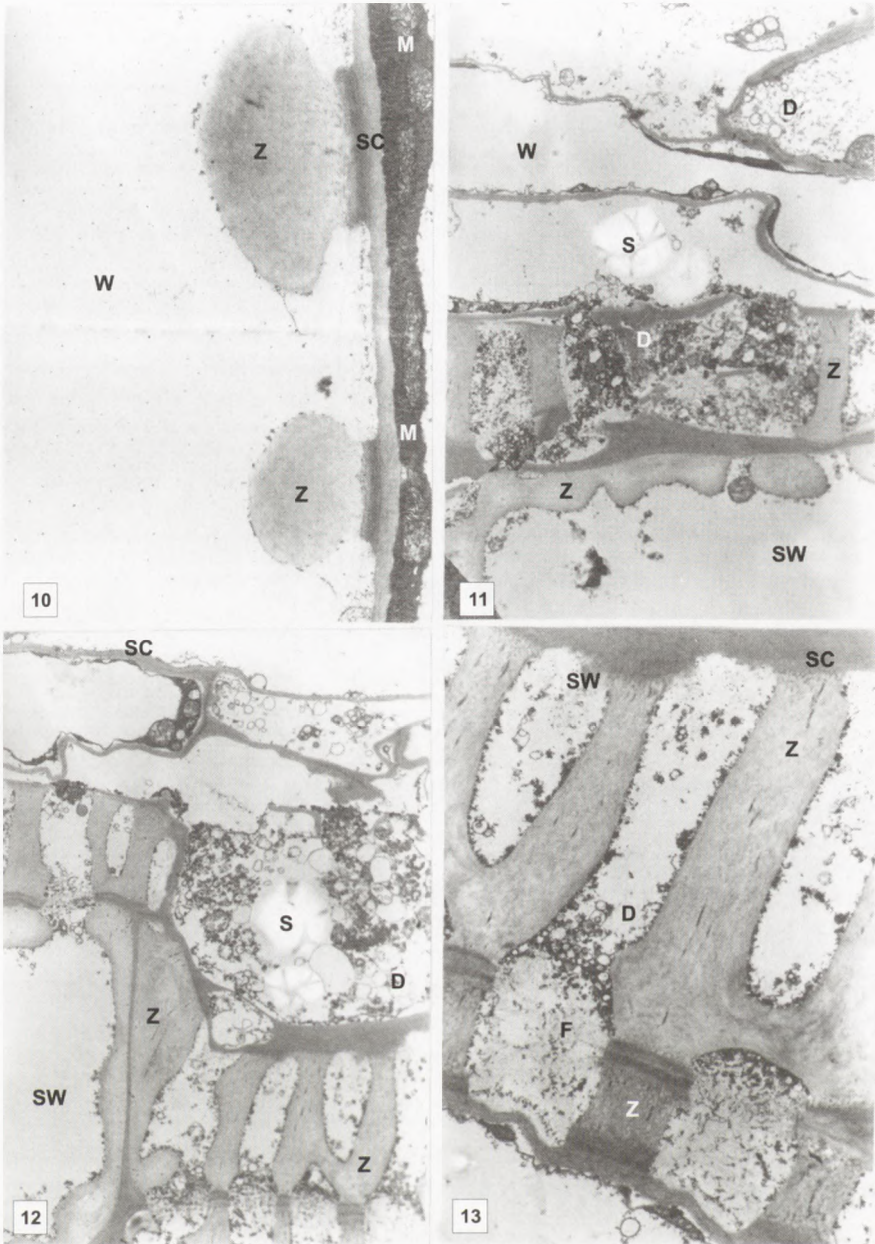


Fot. 6-13. Ultrastruktura kalusa (mikrografie elektronowe). D – degeneracja protoplastu; F – filanty; L – ciała lipidowe; M – mitochondrium; P – plazmalemma; S – ziarno skrobi; SC – ściana komórkowa; SW – światło elementu trachealnego; T – tonoplast; Z – zgrubienia ściany komórkowej.

Fot. 6-7. Zmiany ściany komórkowej i degeneracja protoplastu: fot. 6 – w kalusie morfogennym a, 10 000 ×; fot. 7 – w linii zielonej kalusa, 7500 ×.

Fot. 8. Daleko posunięta degeneracja protoplastu w komórkach kalusa morfogenego a, 15 000 ×.

Fot. 9. Ciała lipidowe zgromadzone przy ścianie komórkowej kalusa morfogenego a, 50 000 ×.



Fot. 10-13. Tworzenie charakterystycznych zgrubień w elementach trachealnych: fot. 10 – w linii zielonej kalusa niemorfogenego, 15 000 ×; fot. 11-13 – w kalusie morfogenym a.

Fot. 11. Komórki pozbawione protoplastu i elementy trachealne z charakterystycznymi zgrubieniami wtórnej ściany komórkowej, 7500 ×.

Fot. 12. Sąsiadujące ze sobą elementy trachealne, 7500 ×.

Fot. 13. Struktura zgrubień ściany komórkowej, 15 000 ×.

4. Dyskusja

Tracheogeneza w tkankach kalusowych jest zjawiskiem powszechnym i charakterystycznym dla procesów cytodyferencji (9-12). Obserwowana była we wszystkich badanych przez nas kalusach. W elementach trachealnych tkanki kalusowej *P. asiatica* występują wyłącznie dwa typy zgrubień ściany komórkowej: helikalne i siatkowate. Uważa się je za charakterystyczne dla elementów trachealnych tkanki kalusowej (10). Fraś i Nowak (9) wyjątkowo obserwowały w kalusach pieprzowca rocznego elementy trachealne o zgrubieniach drabinkowatych i jamkowatych.

Tworzenie kolejnych elementów trachealnych odbywa się najprawdopodobniej poprzez indukcję homeogeniczną – zdeterminowana komórka trachealna wywiera działanie indukujące na leżące obok niej komórki, w wyniku czego mogą się tworzyć ciągi elementów trachealnych lub ich skupienia. Indukcja homeogeniczna może być związana z uwolnieniem substancji wzrostowych w czasie rozkładu protoplastu. Często różnicowanie komórek w elementy trachealne poprzedzone jest podziałem komórek, ale przekształcenia komórki mogą następować też bez podziałów.

Badania w TEM pozwoliły zaobserwować przekształcenia ściany komórkowej, a także radykalne zmiany we wnętrzu komórek polegające na całkowitym zaniku protoplastu, poprzedzonym stopniowym trawieniem składników komórki w wodniczce. Jednak trudno zastosować TEM do systematycznych analiz ze względu na koszty, stosunkowo skomplikowaną procedurę, a także niedostateczne wyposażenie placówek naukowych w mikroskopy elektronowe.

5. Wnioski

1. Tracheogeneza w tkance kalusowej *Plantago asiatica* przebiega podobnie jak u innych roślin.

2. Mikroskop transmisyjny elektronowy daje możliwość prześledzenia etapów tracheogenezy, zbadania ultrastruktury formacji waskularnych.

Literatura

1. Yisheng T., (1996), Zhongcaoyao, 27, 296-298.
2. Andrzejewska-Golec E., (1998), XVII Naukowy Zjazd PTFarm., Kraków.
3. Andrzejewska-Golec E., (1998), 51. Zjazd PTBot., Gdańsk.
4. Andrzejewska-Golec E., Makowczyńska J., Marek K., (2003), Symposium on Electron Microscopy, Poznań, 2002, Pol. J. Pathology, 54, supl. 1,5.
5. Makowczyńska J., Andrzejewska-Golec E., (1998), 51. Zjazd PTBot., Gdańsk.
6. Makowczyńska J., Andrzejewska-Golec E., (2000), Acta Soc. Bot. Pol., 69, 245-250.
7. Makowczyńska J., Andrzejewska-Golec E., (2003), Acta Soc. Bot. Pol., 72, 191-194.
8. Andrzejewska-Golec E., Makowczyńska J., Marek K., (2003), II Kongres Biotechnologii, Łódź.

9. Fraś A., Nowak K., (1995), *Acta Soc. Bot. Pol.*, 64, 5-11.
10. Młodzianowski F., (1984), *Hodowla tkanek i komórek roślinnych*, red. Zenkteler M., PWN, Warszawa, 11-110.
11. Yen H. E., Yen S.-K., (1998), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 58, 59-65.
12. Kopcińska J., (1980), *Wiad. Bot.*, 24, 191-196.