

RAFAŁ MÓL

METODY PRZEJAŚNIANIA TKANEK STOSOWANE W EMBRIOLOGII ROŚLIN

CLEARING METHODS USED IN THE PLANT EMBRYOLOGY

Już ponad 50 lat temu anatomowie roślin zaczęli stosować metody przejaśniania podbarwionych safraniną lub floroglucyną tkanek [11, 20, 40, 45]. Tymi szybkimi metodami — opartymi głównie na działaniu roztworów wodorotlenku sodu i wodoru chloralu — badano: system naczyniowy, rozmieszczenie w tkankach idioblastów, kryształów lub strzępków grzybów [17, 28], zawiązki korzeni bocznych [8, 9, 32], rozwój paprotników [6, 23] oraz rozwój elementów przewodzących w zarodkach [5, 39, 48].

Rutynową metodą w embriologii roślin jest przygotowanie i barwienie skrawków mikrotomowych. Materiał embriologiczny można preparować do mikroskopu świetlnego kilkoma innymi metodami: załączki lub pylniki rozgniecia się w aceto-karminie [7, 10, 27], woreczki załączkowe izoluje się cienkimi igiełkami [31], załączki maceruje się enzymatycznie, a wymacerowane woreczki załączkowe można barwić [14, 16, 44] lub przejaśniać [29, 52]. Wymienionymi metodami bada się sporogenezę i rozwój gametofitu w oderwaniu od tkanek somatycznych. Z tego względu metody te są niekiedy mało przydatne.

Można także obserwować w mikroskopie całe załączki, które stały się przezroczyste pod działaniem płynu przejaśniającego. Strasburger i Hillhouse [46] oraz Poddubnaya-Arnoldi [34, 35] stwierdzili zwiększenie przezroczystości załączków storczyków podczas przyżyciowych obserwacji w roztworach sacharozy. Podobny efekt przejaśnienia opisała Erdelska [15] u załączków *Jasione montana*, hodowanych w płynie silikonowym [Silicone fluid MS 200, Midland Silicone Ltd.].

Dokładne prześledzenie rozwoju megaspor i woreczka załączkowego w obrębie nienaruszonej struktury załączka umożliwiają metody przejaśniania tkanek w płynach Herra lub salicylanie metylu [22, 23, 24, 25, 51].

Autor pragnie tutaj, w oparciu o literaturę, przedstawić metody przejaśniania utrwalonych załączków oraz izolowanych enzymatycznie woreczków załączkowych.

Metoda Herra

Materiał (słupki, pąki lub kwiatostany) utrwała się, jak zaleca Herr [22, 23, 24, 25], w płynie FPA₅₀ (40% formalina : kwas propionowy : 50% etanol = = 5:5:90) przez 24—48 godz., ale np. załączki *Colchicum autumnale* utrwalono 90 min. w zmodyfikowanym FPA₅₀ (7:3:90), [19]. Z badań porównawczych wynika, że dobrze utrwała FPA₅₀ (5:5:90) lub płyn Nawaszina-Randolpha [13, 36]. Formaldehyd zawarty w utrwalczu reaguje z wieloma roślinnymi związkami fenolowymi, tworząc ciemne polimery. Dlatego materiał z dużą zawartością fenoil należy utrwałać w ciepłym, lekko zakwaszonym 70% etanolu przez 1—5 dni i kilkakrotnie wymieniać utrwalczy [17]. Utrwalony materiał przechowywany w 70% etanolu przejaśnia się w płynie Herra. Są cztery rodzaje tego płynu: 1) oznaczony symbolem 4½ — składa się z 85% kwasu mlekowego, wodzianu chloralu, fenolu, olejku goździkowego i ksylenu w proporcji wagowej 2:2:2:2:1 [22], 2) BB-4½ — do 4½ dodana 1 część wagową benzoesu benzylu [25], 3) IKI-4½ — do 9 g płynu 4½ dodane 100 mg jodu i 500 mg jodku potasu [23], 4) PP-4½ — 1 g płynu 4½ z 3 mg nadmanganianu potasu [24]. Najczęściej stosowano płyn 4½. Herr w późniejszych pracach preferuje płyn BB-4½ [18, 26, 36], jakkolwiek do przejaśniania słupków *Eustachys petraea* i *E. glauca* płyn 4½ okazał się najlepszy [2]. Płyn IKI-4½ pozwala wykryć w komórkach skrobię, a ponadto zwiększa kontrastowość obrazu [23]. Nadmanganian potasu w płynie 4½ też polepsza kontrast, ale PP-4½ jest nietrwały [24]. Czas inkubacji zależy od wymiarów załączni, osłonek i ośrodka, i zwykle wynosi 24—28 godz., lecz może być nawet znacznie przedłużony lub skrócony; np. załączki *Tradescantia virginiana*, *Tetralthea pilosa* i *Colchicum autumnale* przejaśniano tylko 30 min. [6, 19].

Utrwalone słupki przekładano do płynu Herra zwykle z 70% etanolu. Czasem jednak załączki z grubszymi osłonkami i ośrodkami, a także nasiona trzeba kilka minut do kilku dni preinkubować w 85% kwasie mlekowym [6, 41], lub parę minut w 10% NaOH — po tym jednak materiał płucze się w wodzie i odwadnia w etanolu [26, 41]. Przed przejaśnieniem dojrzałych ziaren pyłku trzeba enzymatycznie wytrawić materiały zapasowe [36], a z młodych nasion czasem można usunąć igielką zewnętrzną osłonkę [36, 41].

Załączki izoluje się w płynie przejaśniającym pod binokulem, przenosi pipetą na szkiełko Raja (szkiełko przedmiotowe z przyklejonymi balsamem kanadyjskim w odległości 1 cm dwoma szkiełkami nakrywkowymi) i przykrywa szkiełkiem nakrywkowym. Preparaty nadają się do oglądania nawet przez kilka tygodni, jeśli przechowywane są w szalkach Petriego, w lodówce. Co kilkanaście dni trzeba wymieniać płyn przejaśniający, ponieważ rozpuszcza się w nim balsam kanadyjski ze szkiełka Raja. W mikroskopie z kontrastem fazowym widać dość dobrze szczegóły woreczka załączkowego natomiast gorzej komórki ośrodka. Lepsze obrazy daje mikroskop interferencyjny.

Metodą Herra częściej badano rozwój załączka, megasporogenezę i megagametogenezę, a rzadziej embriogenezę, rozwój bielma, mikrosporogenezę i rozwój

pyłku u przedstawicieli *Angiospermae* (Tabela 1). Ponadto obserwowano tą metodą megagametofit *Pinus palustris* w stadium wolnojądrowym [23].

Przejaśnienie w salicylanie metylu

Postępuje się podobnie jak w metodzie Herra. Obiekty utrwalone przez 2—24 godz. w FAA₇₀ (40% formalina : kwas octowy lodowaty : 70% etanol = 5:5:90), odwadnia się w serii etanolu (70%, 80% i trzykrotnie 100%) i przejaśnia w mieszaninach salicylanu metylu i absolutnego alkoholu etylowego (1:1 i 3:1) oraz dwukrotnie w salicylanie metylu; po 1—2 godz. w każdym płynie. Przejaśniony materiał można przechowywać w salicylanie metylu nawet przez rok [51].

Przejaśnione załączki preparuje się analogicznie jak w metodzie Herra, podobne są również obrazy w mikroskopie. Jeżeli używamy zwykłego mikroskopu świetlnego, należy załącznie podbarwić fuksyną zasadową [33] lub hemateiną ałunową [47], a następnie przejaśniać w salicylanie metylu.

Metodą salicylanową badano apomiksję u *Cenchrus ciliaris*, megasporogenezę i megagametogenezę oraz rozwój zarodka i bielma u kilku gatunków (Tabela 1).

Przejaśnianie woreczków załączkowych w laktofenolu

Załącznie utrwała się w FPA lub FAA przez 2—24 godz. (zależnie od wielkości) i przechowuje w 70% etanolu. Z niego przeprowadza się załącznie przez 50% i 30% alkohol do wody destylowanej i płucze się kilka godzin. Wypreparowane pod binokulem załączki inkubuje się w 28—30°C przez 3—6 godz. w wodnych roztworach 1,5—3% *Pectinase*, 1,5—3% *Cellulase* [52] lub 2% *Driselase* [29]. Otrzymaną zawiesinę komórek przepuszcza się przez sito o oczkach 0,45 μm i wiruje się (5 min. przy 50—150 g). Osad płucze się dwukrotnie w laktofenolu (woda destylowana : gliceryna : 85% kwas mlekowy : fenol = 1:2:1:1 cz. wagowych). Wyplukane komórki przejaśnia się 2 godz. i ogląda w laktofenolu [52]. Można też po maceracji przenieść załączki do kropli laktofenolu z gliceryną i delikatnie rozgnieść szkiełkiem nakrywkowym [29]. Dla obserwacji w zwykłym mikroskopie świetlnym korzystne jest wcześniejsze podbarwienie załączków. Metodą tą badano woreczki załączkowe 11 gatunków roślin okrytozałączkowych (Tabela 1) i wczesny rozwój zarodka *Pinus yunnanensis* [30].

Przydatność metod przejaśniania

Metoda przejaśniania załączków w płynie Herra lub w salicylanie metylu jest bardzo szybka i nieskomplikowana. Cała procedura trwa od kilku do 50 godz., czyli dużo krócej niż w metodzie parafinowej. Metody te umożliwiają obserwację załączka z różnych stron, ponieważ delikatnie przesuwając szkiełko nakrywkowe zmieniamy orientację załączka [22, 51]. Z przejaśnianych załączków można zrobić

Zestawienie gatunków *Angiospermae*, dla których stosowano metody przejaśniania tkanek w analizie embriologicznej

Substancja przejaśniająca	Gatunek	Badane struktury						Literatura
		załążek	woreczek załążkowy	zarodek	bielmo	pylnik	ziarno pyłku	
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Płyn Herra	<i>Capsicum annuum</i>	+	+					[1], [13]
	<i>Cassia abbreviata</i>	+	+					[22]
	<i>C. occidentalis</i>	+	+					[26]
	<i>Colchicum autumnale</i>			+	+			[19]
	<i>Cornus alternifolia</i>	+	+					[41], [42]
	<i>C. amomum</i>	+	+					[41], [42]
	<i>C. asperifolia</i>	+	+					[41], [42]
	<i>C. florida</i>	+	+					[41], [42]
	<i>C. stricta</i>	+	+					[41], [42]
	<i>Eustachys petraea</i>	+	+					[2]
	<i>E. glauca</i>	+	+					[2]
	<i>Glottidium vesicarium</i>	+	+	+	+	+	+	[36]
	<i>Glycine max</i>	+	+					[18]
	<i>Ludwigia uruguayensis</i>	+	+					[22]
	<i>Phaseolus aureus</i>	+	+					[18]
	<i>Planera aquatica</i>	+	+					[26]
	<i>Platytheca galioides</i>	+	+					[3]
	<i>Smelovskia calycina</i>	+	+					[21]
	<i>Solidago canadensis</i>	+	+					[43]
	<i>S. graminifolia</i>	+	+					[43]
	<i>Tetratea ciliata</i>	+	+					[3]
<i>T. halmaturina</i>	+	+					[3]	
<i>T. pilosa</i>	+	+					[3], [6]	
<i>Tradescantia virginiana</i>	+	+	+	+			[3], [6]	
<i>Tremandra stelligera</i>	+	+					[3]	
<i>Trifolium repens</i>	+	+					[38]	
Salicylan metylu	<i>Cenchrus ciliaris</i>	+	+					[12], [51]
	<i>Helianthus annuus</i>	+	+	+	+			[49]
	<i>Lilium longiflorum</i>	+	+					[47]
	<i>Medicago sativa</i>	+	+					[4], [33]
	<i>Nicotiana tabacum</i>	+	+					[49]
	<i>Oryza sativa</i>	+	+	+	+			[49]
Laktofenol	<i>Antirrhinum majus</i>		+					[52]
	<i>Atropa belladonna</i>		+					[29]
	<i>Belamcanda chinensis</i>		+					[29]

1	2	3	4	5	6	7	8	9
	<i>Brassica campestris</i>		+					[52]
	<i>Nicotiana tabacum</i>		+					[52]
	<i>Paulownia</i> sp.		+					[50]
	<i>Platycodon grandiflorus</i>		+					[29]
	<i>Sesamum indicum</i>		+					[50]
	<i>Vanilla fragrans</i>		+					[29]
	<i>Vicia faba</i>		+					[52]

preparaty rozgniatane [22, 38] lub półcienkie skrawki [51]. Opracowano metody sporządzania trwałych preparatów przejaśnionych załączków [3, 6, 26], najlepiej w żywicy Spurra [26]. Podczas obserwacji konieczne jest znaczne skupienie uwagi dla właściwego wybierania „skrawków optycznych”. Często przejaśnione załączki trudno sfotografować w mikroskopie kontrastowo-fazowym (lepszy może być mikroskop interferencyjny) i z tego względu w wielu pracach dokumentację stanowią rysunki [2, 13, 18, 36, 43].

Metoda przejaśniania w laktofenolu izolowanych woreczków załączkowych [29, 52] jest porównywalna z opracowanymi wcześniej metodami enzymatycznej lub chemicznej maceracji załączków [7, 10, 14, 16], a barwienie komórek zastąpiono tu przejaśnianiem.

Podsumowując, należy stwierdzić, że metody przejaśniania załączków mogą być cennym uzupełnieniem metody parafinowej szczególnie wówczas, gdy trzeba analizować dużą liczbę załączków. Znaczną popularnością cieszy się metoda Herra, ale przejaśnianie w salicylanie metylu jest równie nieskomplikowane, daje podobne efekty i dlatego jest również godne polecenia.

LITERATURA

- [1] Andrzejewski R. P., Mól R., 1985, Embryological analysis of stages in flower bud development in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.), Bull. Pol. Sci. Acad. B 33, 61—67.
- [2] Aulbach-Smith C. A., Herr J. M. Jr., 1984, Development of the ovule and female gametophyte in *Eustachys petraea* and *E. glauca* (Poaceae), Amer. J. Bot. 71, 427—438.
- [3] Biddle J. A., Christophel D. C., 1978, Intergynoecial development in *Tremandraceae*, Phytomorphology 28, 411—418.
- [4] Bingham E. T., Hawkins-Pfeiffer J., 1984, Female sterility in alfalfa due to a recessive trait retarding integument development, J. Heredity 75, 231—233.
- [5] Bisalputra T., Esau K., 1964, Polarized light study of phloem differentiation in embryo of *Chenopodium album*, Bot. Gaz. (Chicago) 125, 1—7.
- [6] Blackburn D. T., Christophel D. C., 1976, A method of permanently mounting biological tissue cleared in Herr's four- and -half clearing fluid, Stain Technol. 51, 125—130.
- [7] Bradley M. V., 1948, An acetocarmine squash technique for mature embryo sacs, Stain Technol. 23, 29—40.
- [8] Casero P. J., Lloret P. G., Vidal M. R., Abadia-Fenoll F., 1984, A clearing method for the observation of lateral root primordia, J. Microscopy 134, 323—326.

- [9] Charlton W. A., 1975, Distribution of lateral roots and pattern of lateral initiation in *Pontederia cordata* L., Bot. Gaz. 136, 225—235.
- [10] D'Cruz R. D., Reddy P. S., 1967, A modified Bradley's squash technique for studying embryo sacs in *Gramineae*, Stain Technol. 42, 237—240.
- [11] Debenham E. M., 1939, A modified technique for the microscopic examination of the xylem of whole plants or plant organs, Ann. Bot. 3, 369—373.
- [12] De Groote D. K., Sherwood R. T., 1984, *In vitro* sexual and apomictic embryo sac development in *Cenchrus ciliaris*, Can. J. Bot. 62, 2053—2057.
- [13] Dumas de Valux R., Pochard E., 1974, Essai d'induction de la parthénogénèse haploïde par action du protoxyde d'azote sur les fleurs de Piments (*Capsicum annum* L.), Ann. Amélior. Plantes 24, 283—306.
- [14] Enaleeva N. Kh., Tyrnov V. S., Khokhlov S. S., 1972, Isolation of embryo sacs of Angiosperms by tissue maceration, (in Russ). Cytologia i Genetika 6, 439—441.
- [15] Erdelská O., 1983, Microcinematographical investigation of the female gametophyte, fertilization and early embryo and endosperm development, (w) Fertilization and embryogenesis in ovulated plants, Proc. 7th Int. Cytoembryological Symp., red. O. Erdelská, M. Ciamporova, A. Lux, A. Pretová, J. Tupý, Bratislava 49—51.
- [16] Forbes I. Jr., 1960, A rapid enzyme-smear technique for the detection and study of plural embryo sacs in mature ovaries in several Paspalum species, Agron. J. 52, 300—301.
- [17] Gardner R. O., 1975, An overview of botanical clearing technique, Stain Technol. 50, 99—105.
- [18] George G. P., George R. A., Herr J. M. Jr., 1975, A comparative study of ovule and megagametophyte development in field-grown and greenhouse-grown plants of *Glycine max* and *Phaseolus aureus* (*Papilionaceae*), Amer. J. Bot. 66, 1033—1043.
- [19] Gianordoli M., Jalouzet M. F., 1983, Experimental cytochronology of endosperm and embryo development in *Colchicum autumnale* (*Liliaceae*), (w) Fertilization and embryogenesis in ovulated plants, Proc. 7th Int. Cytoembryological Symp., red. O. Erdelská, M. Ciamporova, A. Lux, A. Pretová, J. Tupý, Bratislava, 329—332.
- [20] Gourley J. H., 1930, Basic fuchsin for staining vascular bundles, Stain Technol. 5, 99—100.
- [21] Greene C. W., 1978, A Nomarski interference study of megasporogenesis and metagametogenesis in *Smelovskia calycina* (*Cruciferae*), Amer. J. Bot. 65, 353—358.
- [22] Herr J. M. Jr., 1971, A new clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperms, Amer. J. Bot. 58, 785—790.
- [23] Herr J. M. Jr., 1972, Applications of a new clearing technique for the investigation of vascular plant morphology, J. Elisha Mitchell Sci. Soc. 88, 137—143.
- [24] Herr J. M. Jr., 1973, The use of Nomarski — interference microscopy for the study of structural features in cleared ovules, Acta Bot. Ind. 1, 35—40.
- [25] Herr J. M. Jr., 1974, A clearing-squash technique for the study of ovule development in angiosperms, (w) Vascular Plant Systematics, red. A. E. Radford, W. C. Dickinson, J. R. Bell, New York, 230—235.
- [26] Herr J. M. Jr., 1982, An analysis of methods for permanently mounting ovules cleared in four-and-a-half type clearing fluids, Stain Technol. 57, 161—169.
- [27] Johansen D. A., 1940, Plant microtechnique, McGraw-Hill Book Comp., New York, London.
- [28] Lersten N. R., 1967, An annotated bibliography of botanical clearing methods, Iowa State J. Sci. 41, 481—486.
- [29] Li L. G., Hu S. Y., 1985, Isolation of embryo sac with the enzyme-squash technique, (abstr. in Eng.), Acta Bot. Sin. 27, 567.
- [30] Liu C. Y., 1986, Enzymatic isolation of archegonium of *Pinus yunnanensis* FR and observations, of the proembryo development, (abstr. in Eng.), Acta Bot. Sin. 28, 460.
- [31] Paliwal R. L., 1953, A new technique for the microdissections of embryo sacs of the *Santalalaceae*, Phytomorphology 3, 118—121.
- [32] Pecket R. C., 1957, The initiation and development of lateral meristems in the pea root, I. The effect of young and mature tissue, J. Exp. Bot. 8, 172—180.

- [33] Pfeiffer T. W., Bingham E. T., 1982, Abnormal meiosis in alfalfa, *Medicago sativa*: cytology of 2N egg and 4N pollen formation, *Can. J. Genet. Cytol.* 25, 107—112.
- [34] Poddubnaya-Arnoldi V. A., 1960, Study of fertilization in the living material of some angiosperms, *Phytomorphology* 10, 185—198.
- [35] Poddubnaya-Arnoldi V. A., 1963, The culture of some orchid ovules on an artificial nutritive medium, *J. Indian Bot. Soc.* 42A, 180—184.
- [36] Prakash N., Herr J. M. Jr., 1979, Embryological study of *Glottidium vesicarium* through the use of clearing technique. *Phytomorphology*. 29, 71—77.
- [37] Raj B., Herr J. M. Jr., 1970, The isolation of protoplasts from the placental cells of *Solanum nigrum* L., *Protoplasma* 69, 291—300.
- [38] Rambert D. H. Jr., 1977, Ovule ontogeny, megasporogenesis, and early gametogenesis in *Trifolium repens* (*Papilionaceae*), *Amer. J. Bot.* 64, 483—488.
- [39] Shih C. Y., Peterson C. A., Dumbroff E. B., 1983, A clearing technique for embryos of lipid-storing seeds, *Can. J. Bot.* 61, 551—555.
- [40] Simpson J. L. S., 1929, A short method of clearing plant tissues for anatomical studies, *Stain Technol.* 4, 131—132.
- [41] Smith B. B., 1973, The use of a new clearing technique for the study of early ovule development, megasporogenesis, and megagametogenesis in five species of *Cornus* L., *Amer. J. Bot.* 60, 322—338.
- [42] Smith B. B., 1975, A quantitative analysis of the megagametophyte of five species of *Cornus* L., *Amer. J. Bot.* 62, 387—394.
- [43] Smith B. B., Johnson L. K., 1980, Early ovule development, megasporogenesis and megagametogenesis in *Solidago graminifolia* var. *Nuttalli* and *Solidago canadensis* var. *canadensis* (*Asterales* : *Asterales* : *Tubulifloraceae* : *Asterales*), *Amer. J. Bot.* 67, 612—618.
- [44] Solntzeva M. P., Levkovsky V. P., 1978, Constant Feulgen's stained slides of total embryo sacs isolated by plant tissue maceration, (in Russ.), *Bot. Zhur.* 63, 827—831.
- [45] Stebbins G. L., 1938, A bleaching and clearing method for plant tissues, *Science* 87, 21—22.
- [46] Strasburger E., Hillhouse W., 1900, *Handbook of practical botany*, Mac Millan, New York.
- [47] Van Went J., Van Beek N., Van Tuyl J., 1984, Ovule development in relation to ovule position and flower development in *Lilium*, (w) *Abstr. 8th Int. Symp. on Sexual Reproduction in Seed Plants, Ferns and Mosses, Wageningen*, 61.
- [48] Von Stosch H. A., 1955, Zur Darstellung pflanzlicher Meristeme, *Z. Wiss. Mikrosk. Tech.* 62, 305—310.
- [49] Yang H. Y., 1986, The use of a whole stain-clearing technique for observations on embryo sac, embryo, endosperm and embryoid., (abstr. in Eng.), *Acta Bot. Sin.* 28, 580.
- [50] Yang H. Y., Zhou C., 1984, Observation on megasporogenesis and megagametophyte development in *Paulownia* sp. and *Sesamum indicum* by enzymatic maceration technique, (abstr. in Eng.), *Acta Bot. Sin.* 26, 358.
- [51] Young B. A., Sherwood R. T., Bashaw E. C., 1979, Cleared-pistil and thick-sectioning techniques for detecting aposporous apomixis in grasses, *Can. J. Bot.* 57, 1668—1672.
- [52] Zhou C., Yang H. Y., 1982, Enzymatic isolation of embryo sacs in angiosperms: isolation and microscopical observation on fixed materials (in Chin.), *Acta Bot. Sin.* 24, 403—407.
- [53] Zhou C., Yang H. Y., 1984, The enzymatic isolation of embryo sacs from fixed and fresh ovules of *Antirrhinum majus* L., (abstr. in Eng.), *Acta Biol. Exp. Sin.* 17, 147.

Rafał Mól

Uniwersytet im. A. Mickiewicza

Wydział Biologii, Zakład Botaniki Ogólnej

ul. Stalingradzka 14, 61-713 Poznań