Enzymy hydrolityczne w rozwijającym się woreczku zależkowym lili

Hydrolytic enzymes in developing embryo sac of Lilium candidum

B. RODKIEWICZ, M. KWIATKOWSKA

W komórkach roślinnych wykryto metodami histochemicznymi kilka rodzajów enzymów hydrolitycznych: kwaśną fosfatazę, esterazy niespecyficzne, lipazy itd. Szczególnie aktywne są enzymy w strefach szybkiego różnicowania się, syntezy protoplazmy i tworzenia się naczyń (Glick i Fischer 1946; Wilson i Cutter 1955; literatura zreferowana przez Van Fleeta 1962). W korzeniach najlepiej reakcja na enzymy wychodziła w czepeczku, strefach merystematycznych i histogenach (Beneš i wsp. 1961; Beneš i Opatrná 1964). Pozytywna reakcja na szereg enzymów była demonstrowana w drobnych ziarenkach (0,3—2 μ) cytoplazmy, które z uwagi na podobne spektrum enzymatyczne porównywano do lizosomów komórek zwierzęcych (Beneš i wsp. 1961; Wałek-Czernecka 1962). Analiza przyżyciowa i cytochemiczna łusek cebuli i innych komórek, szczególnie komórek merystematycznych korzeni, pozwoliła autorkom wnioskować, że pozytywnie reagującymi ziarnistościami są sferosomy (Wałek-Czernecka 1962, 1963; Olszewska i wsp. 1963; Olszewska i Gabara 1964). Fosfataza kwaśna oraz inne enzymy znalezione były również w chloroplastach (Mikulska 1962).

Na zdjęciach z mikroskopu elektronowego (elektronogramach) w komórkach zwierzęcych reakcja na kwaśną fosfatazę była wykazywana głównie w lizosomach, słabsza reakcja występowała w błonach protoplazmatycznych i strukturach Golgiego, chociaż te ostatnie w niektórych tkankach były głównymi ośrodkami reakcji (Novikoff i Goldfischer 1961; Essmer i Novikoff 1962; Osinchak 1964).

W tej pracy przeprowadzono reakcje na enzymy hydrolityczne w megasporocycie i we wczesnych stadiach rozwojowych woreczka zależkowego lili (*Lilium candidum*). Rozwój i przemiany struktur mikroskopowych w wymienionym obiekcie są znane z opisów Mottiera (1898), Bouin i Bouin (1899), Ormana (1912) i in.; ultrastrukturalne procesy prześledzono również w mikroskopie elektronowym (Mikulska i Rodkiewicz 1964; Rodkiewicz i Mikulska 1963). Można się było spodziewać, że przynajmniej w niektórych przypadkach uda się skojarzyć lokalizację reakcji enzymatycznych ze strukturami i ultrastrukturami widzianymi na elektronogramach.

METODY

Zalążki *Lilium candidum* utrwalano przez 24 godz. w formalinie Bakera w temp. 4°, następnie hydrolizowano w roztworze pektynazy w buforze octanowym przy pH 4,2 przez 1 godz. w temp. 37°. Po przemyciu 7,5% sacharozą zalążki inkubowano w substratach odpowiednich dla kwaśnej fosfatazy wg Gomoriego (Pearse 1962) i kwaśnej fosfatazy wg Burstona (Burstone 1962), esterazy niespecyficzne wykrywano metodą indygogenną wg Holta (Pearse 1962). Po inkubacji i przeprowadzeniu reakcji na enzymy w całych zalążkach wykonywano z nich preparaty gniecione w glicerynie (Olszewska i wsp. 1963). Stosowano również łączne wykrywanie esterazy niespecyficznej metodą indygogenną i kwaśnej fosfatazy metodą Gomoriego lub Burstona.

OBSERWACJE

Materiałem były kolejne stadia rozwoju, od stosunkowo młodych megasporocytów do wtórnego stadium 4-jądrowego woreczka zalążkowego. Pozytywne wyniki reakcji otrzymano we wszystkich stadiach, jednak

Tablica I

Megasporocyty *Lilium candidum*

- 1 — Reakcja na esterazę niespecyficzną metodą indygogenną, preparat silnie rozplaszczony ($\times 600$).
- 2 — Reakcja na kwaśną fosfatazę metodą Gomoriego ($\times 450$), preparat rozplaszczony.
- 3, 4 — Reakcja na kwaśną fosfatazę metodą Gomoriego ($\times 450$).
- 5 — Woreczek zalążkowy lilii w pierwszym stadium 4-jądrowym po reakcji na esterazę niespecyficzną metodą indygogenną. Preparat rozplaszczony ($\times 500$).
- 6 — Woreczek zalążkowy lilii we wtórnym stadium 4-jądrowym po reakcji na kwaśną fosfatazę metodą Burstona ($\times 500$).

Plate I

Lilium candidum megasporocytes

1. Non-specific esterase. 5-Bromoindoxyl acetate. Preparation flattened.
2. Gomori acid phosphatase. Preparation flattened.
3. Gomori acid phosphatase.
Non-specific esterase. 5-Bromoindoxyl acetate. Embryo sac at the first four-nucleate stage. Preparation flattened.
6. Acid phosphatase. Burstone's Naphtol AS method. Embryo sac at the second four-nucleate stage.

zmianom ulegała wielkość, kształty i ilość produktu reakcji. W młodszych megasporocytach po każdej zastosowanej reakcji znajdowano w cytoplazmie drobne zabarwione ziarenka o średnicy około $2\ \mu$ lub mniejszej. Na $100\ \mu^2$ przekroju optycznego komórki przypadało zwykle 1—2 ziarna (fig. 1 i 2). W nieco starszych megasporocytach obok nielicznych drobnych ziaren były w cytoplazmie duże obszary dające pozytywną reakcję na kwaśną fosfatazę wg Gomoriego (fig. 3). Niekiedy produkt reakcji w części takiego obszaru układał się w struktury pasmowe. Wymiary zabarwionych obszarów sięgały $30\ \mu$ długości i kilkunastu mikronów szerokości. W silnie wydłużonym megasporocycie po reakcji Gomoriego najbardziej uderzającymi strukturami były duże ciemno brązowe kuliste skupienia produktu reakcji (fig. 4), ich średnica dochodziła $20\ \mu$. Obok nich znajdowały się drobniejsze ciała, również ciemno zabarwione.

W pierwszej fazie 4-jądrowego woreczka zalążkowego reakcja na esterazy i kwaśną fosfatazę była wyraźna i obfita. Przy podwójnej reakcji, na oba rodzaje enzymów, produkty barwne leżały blisko siebie w tych samych obszarach cytoplazmy, albo się nakładały. Strefy zabarwione miały przeważnie nieregularne, albo kuliste kształty i dosyć duże wymiary (około $4\ \mu$ średnicy). Na około $200\ \mu^2$ przekroju optycznego znajdowała się jedna taka strefa (fig. 5). Często przy, albo dookoła strefy z produktem reakcji na enzym można zauważyć materiał sudanofilny, co by wskazywało na skupienie materiału lipidowego.

Po pierwszym stadium 4-jądrowym odbywa się dosyć skomplikowany proces podziału i zlewania się jąder komórkowych, w rezultacie którego tworzy się wtórne stadium 4-jądrowe (woreczek zalążkowy lilii rozwija się według typu *Fritillaria*). Obszary zajęte przez produkt reakcji we wtórnym stadium 4-jądrowym przedstawiały się inaczej niż w pierwszym stadium. Występowały mianowicie duże przestrzenie słabo zabarwione, a obok nich lub na ich tle znajdowały się drobne ziarna albo większe utwory ciemno zabarwione (fig. 6). Niektóre z nich miały wymiary około $4\ \mu$, to znaczy zbliżone do wymiarów analogicznych ciał widzianych w stadium poprzednim. W woreczkach zalążkowych w stadiach pośrednich pomiędzy pierwszym a drugim stadium 4-jądrowym reakcje wychodziły w przybliżeniu tak jak w jednym lub drugim opisanym okresie.

DYSKUSJA

Można przyjąć, że produkty reakcji powstające przy zabiegach przeprowadzanych dla wyjawienia hydrolaz stosowanymi tutaj metodami wskazują dosyć dokładnie na lokalizację wewnątrzkomórkową odpowiednich enzymów (Przełęcka 1960). Nasuwa się pytanie, czy enzymy woreczka zalążkowego związane są z jakimiś specyficznymi elementami albo strefami cytoplazmy? Ukształtowanie, wielkość i ilość stref, w któ-

rych jest barwny produkt reakcji, przedstawia się różnie w kolejnych stadiach rozwoju woreczka zalążkowego. W samej tylko megasporocytogenezie wielkość obszarów reagujących zmienia się od 2 μ średnicy do kilkunastu mikronów. Na elektronogramach nie udało się zauważyć żadnego składnika morfotycznego cytoplazmy, który by wykazywał tego rodzaju zmienność. Jak się wydaje wielkość i kształty zabarwionych po reakcji ciał są charakterystyczne dla niektórych określonych faz rozwoju i dadzą się skojarzyć z ujawnionymi na elektronogramach specjal-

Tablica II

Schematy struktur rozwijającego się megasporocytu i woreczka zalążkowego
Lilium candidum

- 7 — Megasporocyt, profile cystern endoplazmatycznego reticulum.
- 8 — Megasporocyt, profile ułożonych równolegle cystern.
- 9 — Megasporocyt, profile cystern zwiniętych w koncentryczne ciała; zewnętrzne błony ulegają rozpadowi na pęcherzyki.
- 10 — Pierwsze stadium 4-jądrowe, rozpadające się układy cystern.
- 11 — Wtórne stadium 4-jądrowe, ośrodki i pola pęcherzyków.
- 7a—11a — Schematy rozmieszczenia produktów reakcji na enzymy hydrolityczne.

Cysterny endoplazmatycznego reticulum przedstawiono pojedynczymi liniami, kropkami oznaczono pęcherzyki powstające z rozpadu cystern (błon plazmatycznych), kreski oznaczają mitochondria i inne struktury o podobnych wymiarach, kółka: ośrodki pozostałe po rozpadzie koncentrycznych układów błon.

Rysowano na podstawie elektronogramów z prac Mikulskiej i Rodkiewicza 1964, Rodkiewicza i Mikulskiej 1964 i nie publ.

Plate II

Diagramatic representation of the structures in a developing megasporocyte and embryo sac of *Lilium candidum*.

- 7 — Megasporocyte, profiles of the endoplasmic reticulum cisterns.
- 8 — Megasporocyte, parallel arrays of cisterns.
- 9 — Megasporocyte, profiles of the cisterns forming spherical concentric bodies. Vesiculation of the outer membranes in multilayered bodies.
- 10 — Embryo sac at the first four-nucleate stage. Massive vesiculation of the endoplasmic reticulum membranes.
- 11 — Embryo sac at the second four-nucleate stage, cores (cytoplasmic bodies) and large areas of the vesicular endoplasmic reticulum.
- 7a—11a — Diagrams of enzymes localization.

Endoplasmic reticulum cisterns drawn as interrupted lines, vesicles arising after cisterns desintegration shown as dots, mitochondria and other particles of similar size presented as dashes, cytoplasmic bodies — cores — remaining after membranes vesiculation shown as circles. Drawn from the electron micrographs made by Mikulska and Rodkiewicz 1964, Rodkiewicz and Mikulska 1965, and unpublished.

Tablica II — Plate II

nymi obszarami cytoplazmy o podobnych wymiarach i kształcie. W tym celu porównywano elektronogramy i preparaty po reakcjach na enzymy z odpowiadających sobie stadiów rozwoju (fig. 7—11 i 7a—11a).

W młodszych megasporocytach barwne produkty reakcji enzymatycznej pojawiają się w postaci drobnych tworów w cytoplazmie (fig. 7a, 1). Tego rzędu wielkość mają mitochondria, ciała osmofilne (prawdopodobnie tłuszczowe), pęcherzykowate ciała z zawartością, traktowane jako degenerujące mitochondria lub partie cytoplazmy, oraz diktiosomy. Mitochondria są o wiele liczniejsze niż barwne ziarenka po reakcji, dlatego mogą być od razu wykluczone jako przypuszczalne miejsca lokalizacji hydrolaz. Nie wiadomo natomiast zupełnie, czy enzymy te są związane z którymś z pozostałych wymienionych elementów, czy są ulokowane gdzie indziej w cytoplazmie.

W starszym megasporocycie (fig. 3, 8, 8a) można znaleźć pewną odpowiedniość kształtów i rozmiarów pomiędzy obszarami reagującymi

w testach na enzymy, a ultrastrukturami cytoplazmy. Reakcja na enzymy obejmuje duże wydłużone pola noszące ślady struktury warstwowej, mogłyby one być odniesione do tej części cytoplazmy, gdzie są ogromne zespoły równoległych cystern endoplazmatycznego reticulum. W dalszym rozwoju megasporocytu równoległe układy cystern zamieniają się w układy sferyczne, widziane na przekroju w postaci koncentrycznych zamkniętych ciał o średnicy kilkunastu mikronów (fig. 9). W wydłużonym megasporocycie zewnętrzne membrany tych układów zaczynają się rozpadać na drobne pęcherzyki o średnicy około $0,1 \mu$. Obszar cytoplazmy zabarwione po reakcji na hydrolazy odpowiadają dosyć dobrze kształtem i wielkością opisanym układom (fig. 4, 9, 9a).

Duże wielowarstwowe układy podwójnych membran stopniowo ulegają zmniejszeniu. W pierwszym 4-jądrowym stadium pozostają głównie układy niewielowarstwowe z rozpadającymi się na pęcherzyki membranami. Wielkość tych ciał waha się w szerokich granicach, ale sporo ma średnicę rzędu 4μ , podczas gdy inne składniki cytoplazmy są dużo mniejsze. I znów porównując ten obraz z obrazem rozmieszczenia produktów reakcji enzymatycznej (fig. 5, 10 i 10a) można wnioskować o lokalizacji enzymów w obszarach z rozpadającymi się błonami protoplazmatycznymi. Po zaniku koncentrycznych ciał we wtórnym stadium 4-jądrowym w cytoplazmie pozostają ośrodki tych ciał, rozległe pola wypełnione pęcherzykami powstałymi z błon protoplazmatycznych i tylko nieliczne układy warstwowe. Dyfuzyjna, słaba reakcja zachodzi prawdopodobnie na polach pęcherzyków, a silniejsza w ostatnich zanikających układach koncentrycznych membran (fig. 6, 11 i 11a).

Wydaje się prawdopodobne przypuszczenie, że w woreczku zalążkowym lili enzymy hydrolityczne (kwaśna fosfataza i niespecyficzna esteraza) występują w mniejszych lub większych strefach cytoplazmy bogatych w membrany protoplazmatyczne, szczególnie membrany ulegające rozpadowi.

STRESZCZENIE

W rozwijającym się woreczku zalążkowym lili (*Lilium candidum*) występuje pozytywna reakcja na enzymy hydrolityczne — esterazy niespecyficzne i kwaśna fosfatazę. Porównywano preparaty mikroskopowe po przeprowadzeniu reakcji na enzymy ze zdjęciami w mikroskopie elektronowym takich samych komórek, na których reakcji nie przeprowadzano.

Można przypuścić, że przynajmniej w niektórych stadiach produkt reakcji na enzymy (znamięnujący obecność enzymu) znajduje się w strefach cytoplazmy bogatych w błony protoplazmatyczne (endoplazmatyczne reticulum), szczególnie zaś w błony ulegające rozpadowi na pęcherzyki o średnicy około $0,1 \mu$.

SUMMARY

In developing embryo sac of *Lilium candidum* positive reactions for hydrolytic enzymes — nonspecific esterases and acid phosphatase — were obtained. The microscopic preparations after enzymatic tests were compared with the electron microscope photographs of the same cells on which no such tests were carried out.

It can be assumed that at least in some stages the reaction product indicating the presence of a given enzyme is localized in protoplasmic regions rich in endoplasmic reticulum and especially in membranes which disintegrate in vesicles of ca 0.1 μ in diameter.

Department of Plant Anatomy and Cytology
University of Łódź

LITERATURA

- Beneš K., Z. Lojda, B. Horavka, 1961, A contribution to the histochemical demonstration of some hydrolytic and oxydative enzymes in plants, *Histochemie* 2:313—321.
- Beneš K., J. Opatrná, 1964, Localization of acid phosphatase in differentiating root meristem, *Biol. Plantarum* (Praha) 6:8—16.
- Bouin M., P. Bouin, 1898, Sur le développement de la cellule-mère du sac embryonnaire des Liliacées et en particulier sur l'évolution des formations ergastoplasmiques, *Arch. d'anat. microsc.* 2:419—454.
- Burstone M. S., 1962, *Enzyme histochemistry*, Acad. Press N.Y. a. London.
- Essner E., A. B. Novikoff, 1962, Cytological studies on two functional hepatomes, interrelations of endoplasmic reticulum, Golgi apparatus and lysosomes, *J. Cell Biol.* 15:289—312.
- Glick D., E. E. Fischer, 1946, Localization of phosphatases in the wheat grain and the epicotyl and roots of the germinated grain, *Arch. Biochem.* 11:65—79.
- Mikulska E., 1962, Recherches cytochimiques sur la présence d'enzymes dans les chloroplastes. I. Estérases non spécifiques et lipases. II. Phosphatases, *Bull. Soc. Sc. Lett. Łódź.* 13(9):1—3, 13(10):1—3.
- Mikulska E., B. Rodkiewicz, 1964, Struktury cytoplazmatyczne megasporocyty i woreczka zalążkowego lilii obserwowane w mikroskopie elektronowym, *Acta Soc. Bot. Pol.* 33:619—630.
- Mottier D. M., 1898, Ueber das Verhalten der Kerne bei der Entwicklung des Embryosacks und die Vorgänge bei der Befruchtung, *Jahrbuch. f. wiss. Bot.* 31:125—158.
- Novikoff A. B., S. Goldfischer, 1961, Nucleosidediphosphatase activity in Golgi apparatus and its usefulness for cytological studies, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 47:802—810.
- Olszewska M. J., B. Gabara, 1964, Recherches cytochimiques sur la présence de certaines hydrolases au cours de la cytocinèse chez les plantes supérieures, *Protoplasma* 59:163—179.
- Olszewska M. J., B. Gabara, S. Ohde, 1963, Méthode simple pour la préparation des méristèmes radiculaires permettant la détection cytochimique de certaines hydrolases, *Acta Soc. Bot. Pol.* 32: 651—654.

- Orman E., 1912, Recherches sur les différenciations cytoplasmiques (ergastoplasme et chondriosomes) dans les végétaux: I. Le sac embryonnaire des Liliacées, *La Cellule* 28: 365—441.
- Osinchak J., 1964, Electron microscopic localization of acid phosphatase and thiamine pyrophosphatase activity in hypothalamic neurosecretory cells of the rat, *J. Cell Biol.* 21: 35—47.
- Pearse A. G. E., 1962, *Histochemistry*, Churchill Ltd., London.
- Przełęcka A., 1960, Metody cytochemicznego wykrywania niektórych hydrolaz, *Fol. Morph.* 19: 217—229.
- Rodkiewicz B., E. Mikulska, 1963, Electron microscope observations of cytoplasmic changes in developing megasporocyte of *Lilium candidum*, *Flora* 154: 383—387.
- Rodkiewicz B., E. Mikulska, 1965, Electron microscope observations of endoplasmic reticulum in lily megasporocyte, *Flora* 155: (w druku).
- Van Fleet D. S., 1962, Histochemistry of enzymes in plant tissues, w *Handbuch der Histochemie VII/2*. Graumann W., K. Neumann, Fischer Velr., Stuttgart.
- Wałek-Czernecka A., 1962, Mise en évidence de la phosphatase acide dans les sphérosomes des cellules écailles bulbaires d'*Allium cepa*, *Acta Soc. Bot. Pol.* 32: 539—543.
- Wałek-Czernecka A., 1963, Note sur la détection d'une estérase non spécifique dans les sphérosomes, *Acta Soc. Bot. Pol.* 32: 405—408.
- Wilson K. S., V. M. Cutter, 1955, Localization of acid phosphatase in the embryo sac and endosperm of *Cocos nucifera*, *Amer. J. Bot.* 42: 116—119.