Występowanie esteraz we włoskach gruczołowych i liściach *Drosera rotundifolia*

Sur la présence des estérases dans les tentacules et les feuilles de Drosera rotundifolia

I. PALCZEWSKA

Do badań histochemicznych i cytochemicznych u roślin owadożernych zachęca ich specyficzny sposób odżywiania się. Pozwala on prześledzić aktywność enzymów hydrolitycznych czynnych wewnątrz włosków trawiących oraz wydzielanych na zewnątrz.

Aktualny stan badań biochemicznych nad enzymami wydzielanymi przez te rośliny w czasie trawienia dostarcza pewnych danych, które mogą stanowić punkt wyjściowy dla obserwacji histochemicznych. Proteazy wykryte przez biochemików w wydzielinie liści różnych gatunków *Drosera* działają w zakresie pH 1,5–4,6 (cyt. za Schmuckerem i Linnemanem 1959). U *Drosera* zostały znalezione przez Lindstroma-Langa i Holtera dwa enzymy proteolityczne, mianowicie jeden sekrecyjny z włosków, oraz drugi — endoenzym — wyizolowany z liścia (cyt. za van Fleetem 1962).

Nie przeprowadzano dotąd badań histochemicznych nad enzymami hydrolitycznymi zawartymi we włoskach *Drosera*. Niniejsze wyniki traktuję jako wstępne w szerzej zakrojonych badaniach nad enzymami hydrolitycznymi u roślin owadożernych.

MATERIAŁ I METODY

Zebrane na torfowisku okazy *Drosera rotundifolia* przechowywano wraz z podłożem w naczyniach szklanych. Reakcje przeprowadzano najpóźniej w ciągu dwóch tygodni, po przeniesieniu roślin ze środowiska naturalnego.

Już wstępne obserwacje wykazały, że włoski rosiczki stanowią niedogodny materiał do badań cytochemicznych. Szczególną trudność przedstawiają komórki warstwy wydzielniczej ze względu na małą objętość i wypełnienie wodniczками. Komórki nóżki są dość duże, wydłużone i właśnie one bywały dotąd obiektem obserwacji cytologicznych. Zajmowano się przy tym wyłącznie wodniczками, a zjawisko ich agregacji w czasie trawienia zostało wielokrotnie opisane (ref. Uphof 1962).

Po przeprowadzeniu szeregu próbných reakcji na różne enzymy hydrolityczne, wybrano metodę indygową, stosowaną dla wykrywania esterazy niespecyficznej. Metoda ta jest w przypadku rosiczki najbardziej przydatna ze względu na niebieski produkt reakcji, wyraźnie widoczny w komórkach wypełnionych wodniczками

zabarwionymi intensywnie czerwono. Reakcje enzymatyczne, których produkty posiadają różne odcienie czerwieni lub brązu, okazały się dla tego materiału nie-
użyteczne.

Zastosowanie metody Gomoriego dla wykrywania aktywności kwaśnej fosfatazy jest uniemożliwione przez obecne w komórkach kompleksy antocjanowo-taninowe, dające z solami metali ciężkich nierozpuszczalne związki.

Do reakcji na esterazę indoksylową utrwalano fragmenty liści wraz z włoskami w formalinie wapniowej Bakera w 4°C w ciągu 18–24 godz., następnie poddawano je maceracji pektynazą wg metody opisanej przez Olszewską i wsp. (1963). Zmacerowane liście umieszczano w środowisku inkubacyjnym wg Pearse'a (1961) na okres 1.5 godz. w 37°C. Jako substratu używano 0-acetylo-5-bromindoksyłu. W celu wykrycia esterazy E-600 odpornej stosowano równolegle inkubację w środowisku z dodatkiem tego inhibitora w stęż. 10^{-5} M (Pearse 1961).

Reakcję na esterazę wrażliwą i oporną na E-600 przeprowadzano w liściach roślin, które karmiono gotowanym białkiem jaja kurzego. Białko podawano liściom dojrzałym, świeżo rozwiniętym, na których nie było resztek owadów. Na główkach włosków w takich liściach występowały krople płynu sekrecyjnego. Liście utrwalano jak wyżej, po 3, 5, 7, 8 godzinach trawienia od chwili podania białka. W miejscu zetknięcia z fragmentem białka po 5 godzinach widoczne były na liściu spływające stamtąd krople wydzieliny główki; włoski przylegające do białka zmieniały zabarwienie z czerwonego na fioletowobrunatne. Fragment liścia, który zetknął się z białkiem dzielono na dwie części, jedną z nich inkubowano w substracie bez E-600, drugą — w substracie z dodatkiem tego inhibitora. Równocześnie przeprowadzano także inkubację dla liści kontrolnych tj. nie karmionych białkiem.

Dla demonstracji aktywności proteolitycznej włosków u *Drosera* używano dwu metod opartych o zasadę podaną przez Adamsa i Tuqana (1960). Stosowano płyty fotograficzne (GP 5.5 Foton) naświetlone i wywołane wg zwykłej procedury oraz szkiełka powleczone emulsją autoradiograficzną L 4 Ilford, następnie naświetlone i wywołane. Drobniejszy wymiar ziaren w emulsji autoradiograficznej zwiększa zdolność rozdzielczą (Olszewska, nieopubl.). Powierzchnię emulsji zwilżano buforem o pH 5 i 7.6; w zwilżonych miejscach umieszczano odcięte włoski albo całe liście. Materiał inkubowano w kamercie wilgotnej w temp. 37°C w ciągu 2 godz.

WYNIKI

Przedstawiony schemat budowy włoska wydzielniczego ułatwi zorientowanie się w lokalizacji esterazy (fig. 1 w tekście).

Wnętrze włoska jest zajęte przez dużą grupę cewek otoczoną warstwą małych komórek o skutynizowanych ścianach promienistych (warstwa pośrednia). Nad nimi leżą jeszcze dwie warstwy małych komórek, z których zewnętrzna jest utworzona z wydłużonych komórek wydzielniczych. U nasady główki występuje grupa komórek bezbarwnych lub zabarwionych bladozielono. Na nóżce włoska widoczne są liczne gruczołki zbudowane z kilku komórek. Zarówno komórki wydzielnicze, jak i komórki gruczołów pozbawione są kutikuli.

W czasie obserwacji przyżyciowych można dostrzec w komórkach nóżek włosków dość liczne utwory ziarniste o średnicy $0,3-0,5\ \mu$, silnie załamujące światło, poruszające się szybko, odpowiadające wyglądem sferosomom. Ziarnistości te wykazują aktywność esterazy indoksylowej: zabarwiają się na niebiesko osadami indyga. W przypadku szczególnie intensywnej reakcji następuje pękanie sferosomów, mają one wtedy kształt nieregularny. Obraz wewnątrzkomórkowej lokalizacji

Fig. 1. Schemat budowy włoska gruczołowego u *Drosera rotundifolia*

1—warstwa komórek wydzielniczych; 2—warstwa pośrednia; 3—grupa cewek; 4—gruczołki.

Schéma d'un tentacule de *Drosera rotundifolia*.

1—couche des cellules sécrétrices; 2—couche intermédiaire; 3—trachéïdes; 4—papilles.

esterazy przedstawia fig. 1, tabl. I. Jednakże w wielu komórkach ilość ziarenek niebieskich jest większa od ilości sferosomów obserwowanych w komórkach żywych. Stwierdza się mianowicie wzrost ilości ziarenek bardzo małych. Podobne obserwacje dotyczące komórek skórki cebuli *Allium cepa* podaje Wałek-Czernecka (1963).

W dojrzałym włosku największą aktywność posiada strefa, gdzie występują cewki. Włoski obserwowane pod małym powiększeniem wykazują w tym miejscu rozlane niebieskie zabarwienie (tabl. I, fig. 2). Podobnie intensywnie zabarwione są gruczołki znajdujące się na nóżkach (tabl. I, fig. 6). W liściu silną reakcję obserwuje się wzdłuż wiązek przewodzących (tabl. I, fig. 4). Przy dużym powiększeniu można stwierdzić, że ściany cewek w główce zabarwione są na niebiesko; poza tym występują na nich jeszcze niebieskie ziarenka. Podobnie wyglądają naczynia znajdujące się w nóżce. W nóżce obfity drobnoziarnisty osad indyga występuje w wąskich bezbarwnych komórkach mięksiszowych otaczających wiązkę naczyniową. W komórkach powierzchniowych nóżki najwięcej ziarenek zabarwionych wystę-

puje w dolnej części nóżek włosków brzeżnych. Włoski środkowe, o nóżkach krótkich posiadają mniejszą ilość zabarwionych ziarenek. Kilka niebiesko zabarwionych dość dużych ziarenek występuje także w komórkach powierzchniowych główki.

W materiale poddanym działaniu E-600 nie obserwuje się niebieskiego zabarwienia w strefie cewek w główkach oraz w wiązkach przewodzących liści. Lokalizacja indyga ogranicza się do ziarnistości cytoplazmatycznych. Ze względu na trudności obserwacji nie można zdecydować, czy ilość sferosomów zabarwionych zmniejsza się, a tym bardziej, czy zmniejsza się intensywność ich zabarwienia.

Porównanie wyników u roślin kontrolnych i karmionych białkiem pozwala stwierdzić, że w liściach którym podano białko w ciągu 5, 7, 8, godzin brak jest zabarwienia E-600 wrażliwego w wiązkach przewodzących blaszki liściowej. Innych różnic w lokalizacji i aktywności esteraz E-600 opornych i wrażliwych nie daje się zauważyć.

Sprawdzenie przydatności metody wykrywania proteaz, wydzielanych przez włoski trawienne rosiczki, dało wynik pozytywny (tabl. I, fig. 3, 5). W wyniku aktywności proteaz obserwuje się jasną przestrzeń, powstałą wskutek hydrolizy enzymatycznej żelatyny. Wytrawianie żelatyny zachodzi w okolicy części szczytowej główek, u ich podstawy, na powierzchni nóżek, oraz w miejscach przylegających do gruczołków na nóżce (tabl. I, fig. 3). Obrazy takie otrzymano w preparatach, gdzie trawienie przebiegało przy pH 5. Proces trawienia był mniej intensywny przy pH 7,6. Należy się liczyć w tym wypadku z możliwością wydzielania

Tablica 1 — Table 1

1. Lokalizacja esterazy indoksylowej w komórkach skórki nóżki włosków. Pozytywna reakcja w sferosomach. Pow. ok. 900×.
Localisation de l'indoxylestérase dans les cellules épidermiques du pied tentaculaire. Les sphérosomes présentent la coloration enzymatique. Agr. env. 900×.
2. Lokalizacja esterazy indoksylowej we włoskach gruczołowych. Reakcja najintensywniejsza w strefie tracheid. Pow. ok. 45×.
Localisation de l'indoxylestérase dans les tentacules. La plus forte activité se manifeste aux environs des trachéides. Agr. env. 45×.
3. Aktywność proteolityczna komórek powierzchniowych główki włoska oraz gruczołów na nóżce. Emulsja L4 Ilford. Pow. ok. 45×.
Activité protéolytique des cellules superficielles de la tête tentaculaire et des papilles du pied. Emulsion Ilford L4. Agr. env. 45×.
4. Lokalizacja esterazy indoksylowej w wiązkach przewodzących liścia. Pow. ok. 45×.
Activité indoxylestérasique dans les faisceaux de la feuille. Agr. env. 45×.
5. Aktywność proteolityczna części szczytowej główki. Płyta fotograficzna GP 5.5 Foton. Pow. ok. 45×.
Activité protéolytique de la partie apicale de la tête tentaculaire Cliché GP 5.5 Foton. Agr. env. 45×.
6. Lokalizacja esterazy indoksylowej w gruczołach występujących na nóżkach włosków. Pow. ok. 120×.
Activité indoxylestérasique des papilles du pied tentaculaire. Agr. env. 120×.

Tablica 1 — Table 1

kwasów przez włoski. Lüttage (1964) wykrył w soku sekrecyjnym u *Nepenthes* i *Dionaea* kwasy: mrówkowy i benzoesowy, co mogłoby spowodować zmianę pH w kierunku bardziej kwaśnym.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wyniki badań nad wewnątrzkomórkową lokalizacją esterazy indoksylowej we włoskach gruczołowych *Drosera rotundifolia* potwierdziły dane otrzymane dla innych roślin (Wałek-Czernecka 1962, 1963, 1965; Olszewska i Gabara 1964; Górską-Brylass 1965), wskazujące, że sferosomy są siedliskiem tego enzymu hydrolitycznego. Dyfuzyjne zabarwienie enzymatyczne cytoplazmy było w wypadku esteraz niespecyficznych obserwowane w materiale roślinnym (Wałek-Czernecka 1963) oraz zwierzęcym (Shnitka i Seligman 1961; Wachstein i Meisel 1960). Zabarwienie nie występowało w obecności E-600, co wskazywałoby, że esterazy wrażliwe na ten inhibitor znajdują się w cytoplazmie, natomiast wyłącznym siedliskiem esteraz E-600 opornych są w materiale roślinnym sferosomy (Wałek-Czernecka 1965), w materiale zwierzęcym — lizosomy (Shnitka i Seligman 1961). Esteraza E-600 oporna uważana jest za proteazę — katepsynę C (Pepler i Pearse 1956; Hess i Pearse 1958).

Histochemicznie stwierdza się lokalizację esterazy indoksylowej w główce w strefie tracheid, a w nóżce — w tracheidach i komórkach je otaczających oraz w wiązkach przewodzących w liściu. Występowanie tego typu esterazy w naczyniach obserwowała także Wałek-Czernecka w piętkce cebuli (nie opubl.). W tym samym materiale esteraza indoksylowa była także obecna w łyku wiązek przewodzących (Wałek-Czernecka 1965). Autorka zaobserwowała, że po skaleczeniu piętki barwny produkt reakcji występował nie tylko w cytoplazmie, ale nawet w przetworach międzykomórkowych. Przypomina to obraz lokalizacji tego enzymu w tracheidach *Drosera*. Autorka sugeruje, że następuje tutaj przenikanie enzymów ze sferosomów do całej komórki, a nawet otoczenia.

Beneš (1962) metodą sprzęgania z barwnikami azowymi wykrył esterazę niespecyficzną w łyku korzenia *Vicia faba*. U *Drosera* brak jest typowych rurek sitowych (cyt. za Schmuckerem i Linnemanem 1959). Jednakże intensywną reakcję enzymatyczną obserwuje się tutaj w komórkach otaczających tracheidy w nóżce.

Zanik aktywności esterazy indoksylowej, występujący w wiązkach przewodzących liści karmionych białkiem jaja kurzego w ciągu 5—8 godzin, może być spowodowany przemieszczaniem się enzymów do włosków trawiennych, z czego wynikałoby, że właśnie na ten okres przypada największa intensywność procesu trawienia.

Obecna w sferosomach esteraza E-600 oporna uważana jest za enzym proteolityczny wewnątrzkomórkowy. Proteazy wykrywane metodą emulsji fotograficznej są natomiast wydzielane na zewnątrz; o ich lokalizacji wewnątrzkomórkowej z powodu braku metod nie można w tej chwili nic powiedzieć.

Również sprawą otwartą jest pochodzenie esterazy indoksylowej, zlokalizowanej

poza sferosomami. Pęknięte sferosomy w komórkach dolnych części włosków przypominają podobne obrazy z warstwy wyścielającej *Larix* (Wałek-Czernecka 1965). Nie jest wykluczone, że dyfuzyjne zabarwienie enzymatyczne cytoplazmy i zawartość cewek u *Drosera* jest wynikiem wydostania się enzymu ze sferosomów.

Streszczenie

Badano lokalizację esterazy indoksylowej E-600 wrażliwej i E-600 odpornej we włoskach gruczołowych i liściach *Drosera rotundifolia*.

Sferosomy są jedynym miejscem występowania esterazy E-600 odpornej, a głównym miejscem występowania esterazy indoksylowej. Enzym ten może występować także w cytoplazmie.

Miejscem największej aktywności esteraz E-600 wrażliwych są grupy tracheid w główce, występujące w nóżce gruczołki oraz wiązki przewodzące w blaszce liściowej. W liściach karmionych białkiem jaja kurzego przez 5—8 godzin ten typ aktywności enzymowej zanika. Za pomocą emulsji fotograficznej stwierdzono, że komórki powierzchniowe główki oraz gruczołki na nóżce włoska gruczołowego wydzielają na zewnątrz enzymy proteolityczne.

Zakład Cytochemii,

Katedra Anatomii i Cytologii Roslin

Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź, Nowotki 18.

(Wpłynęło: dn. 4.XII.1965 r.)

RÉSUMÉ

On a étudié la localisation de l'indoxyl estérase E-600 résistante et E-600 sensible dans les tentacules et les feuilles de *Drosera rotundifolia*.

L'indoxyl estérase est située surtout dans les sphérosomes; le cytoplasme possède aussi une faible activité indoxyl estérasiq. L'estérase E-600-résistante est localisée uniquement dans les sphérosomes.

Les trachéides de la tête tentaculaire, les trachéides et les papilles du pied tentaculaire, ainsi que les faisceaux des feuilles présentent la plus forte activité E-600 sensible. Cette activité disparaît des feuilles nourries pendant 5—8 heures par du blanc d'oeuf.

En utilisant les émulsions photographiques on a démontré la localisation histologique de l'activité protéolytique. Les protéases sont sécrétées par les cellules superficielles de la tête tentaculaire, ainsi que par les papilles du pied.

LITERATURA

- Adams C. W. M., Tuqan N. A., 1960, The histochemical demonstration of protease by gelatin-silver film substrate, J. Histochem. Cytochem. 9: 469—472.
- Beneš K., 1962, Gistochimickeskie dokazatelstvo esterazy azakuplacionnym metodom w korniewoj wierchuszkie boba *Vicia faba*, Biol. Plant. (Praha) 4: 211—219.
- Van Fleet D. S., 1962, Histochemistry of enzymes in plant tissues. In "Handbuch der Histochemie", VII-Enzyme, II Teil. G. Fischer-Ver. Stuttgart.
- Górska-Brylarska A., 1965, Hydrolases in pollen grain and pollen tubes, Acta Soc. Bot. Pol. 34: 589—604.
- Hess R., Pearse A. G. E., 1958, The histochemistry of indoxylesterase of rat kidney with special references to its cathepsinlike activity, Brit. J. Exptl. Pathol. 39: 292—296.

- Lüttge U., 1964, Untersuchungen zur Physiologie der Carnivoren-Drüsen. I Mit. Die an den Verdauungsvorgängen beteiligten Enzyme, *Planta* 63: 103—117.
- Olszewska M. J., Gabara B., Ohde S., 1963, Méthode simple pour la préparation des méristèmes radiculaires permettant la détection cytochimique de certaines hydrolases, *Acta Soc. Bot. Pol.* 32: 651—654.
- Olszewska M. J., Gabara B., 1964, Recherches cytochimiques sur la présence de certaines hydrolases au cours de la cytocinèse chez les plantes supérieures, *Protoplasma* 59: 163—179.
- Pearse A. G. E., 1961, *Histochemistry, theoretical and applied*, J. and A. Churchill Ltd., London.
- Pepler W. J., Pearse A. G. E., 1956, The histochemistry of the esterase of rat brain, with special reference to those of the hypothalamic nuclei, *J. Neurochem.* 1: 193—201.
- Schmucker Th., Linneman G., 1959, Carnivorie s. *Handbuch der Pflanzenphysiologie* 11, pp. 226—239, Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- Shnitka T. K., Seligman A. M., 1961, Role of esteratic inhibition on localization of esterase and the simultaneous cytochemical demonstration of inhibitor sensitive and resistant enzyme species, *J. Histochem. Cytochem.* 9: 504—527.
- Uphof J. C. T. H., 1962, *Plant hairs*, Berlin, pp. 181—184.
- Wachstein M., Meisel E., 1960, Histochemistry of "thiolacetic*acid esterase" in relation to de Duve's lysosomes, *J. Histochem. Cytochem.* 8: 317—318.
- Wałek-Czernecka A., 1962, Mise en évidence de la phosphatase acide (monophosphoestérase II) dans les sphérosomes des cellules épidermiques des écailles bulbaires d'*Allium cepa*, *Acta Soc. Bot. Pol.* 31: 539—542.
- Wałek-Czernecka A., 1963, Note sur la détection d'une estérase non spécifique dans les sphérosomes, *Acta Soc. Bot. Pol.* 32: 405—408.
- Wałek-Czernecka A., 1965, The histochemical demonstration of some hydrolytic enzymes in spherosomes in plant cells, *Acta Soc. Bot. Pol.* 34: 573—588.