



## Plastydy w tkance kalusowej *Plantago asiatica* L.

Joanna Makowczyńska<sup>1</sup>, Emilia Andrzejewska-Golec<sup>1</sup>,  
Krystyna Marek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny,  
Łódź

<sup>2</sup>Zakład Mikroskopii Elektronowej, Uniwersytet Medyczny, Łódź

### Plastids in callus tissue culture of *Plantago asiatica* L.

#### Summary

For the last few years, in the Department of Biology and Pharmaceutical Botany – *Plantago asiatica* L. – a medicinal plant, popular in the Far East, has been cultured *in vitro*. Two lines of the nonmorphogenic callus were obtained: cream- and green-coloured. They were induced from the roots taken from 4-week-old seedlings. The cream-coloured callus was cultured on Murashige and Skoog medium enriched with 0.5 mg/dm<sup>3</sup> 2,4-D and 0.2 mg/dm<sup>3</sup> BAP. The green callus was initiated on the same medium supplemented with 0.1 mg/dm<sup>3</sup> IAA and 2 mg/dm<sup>3</sup> BAP and next it was cultured on MS with 0.5 mg/dm<sup>3</sup> IAA and 0.2 mg/dm<sup>3</sup> BAP. The fragments of the callus were studied using the light microscope and the transmission electron microscope. For cream-coloured callus, proplastids and amyloplasts were observed. In green callus, in addition to the plastids found in cream-coloured callus, also chloroplasts were observed.

#### Key words:

callus cultures, callus plastids, plastid 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

Kalus *Plantago asiatica* L. w hodowli *in vitro* uzyskał po raz pierwszy Yisheng w roku 1996 (1) regenerując tę dalekowschodnią roślinę na drodze organogenezy pośredniej. Autor ten jednak nie analizował tkanki kalusowej, ani w mikroskopie świetlnym, ani elektronowym. Wyniki badań histologicznych kalusa babki azjatyckiej opublikowały w roku 2000 Makowczyńska

i Andrzejewska-Golec (2). Andrzejewska-Golec i wsp. przedstawiła własne wyniki badań kalusa *P. asiatica* na Sympozjum Mikroskopii Elektronowej w Poznaniu w roku 2002 (3) oraz na II Krajowym Kongresie Biotechnologii w Łodzi (4).

Obecna praca poświęcona jest szczegółowym badaniom plastydów w tkance kalusowej *P. asiatica*.

## 2. Materiał i metody

Materiał: – kalus niemorfogeny *P. asiatica*: linia kremowa, linia zielona; – kalus morfogeny *P. asiatica* wyhodowany na podłożu MS wzbogaconym 0,2 mg/dm<sup>3</sup> IAA i 1 mg/dm<sup>3</sup> BAP.

Linie kremową indukowano i pasażowano na podłożu MS z dodatkiem 0,5 mg/dm<sup>3</sup> 2,4-D i 0,2 mg/dm<sup>3</sup> BAP, natomiast linię zieloną najpierw indukowano na podłożu MS wzbogaconym 0,1 mg/dm<sup>3</sup> IAA i 2 mg/dm<sup>3</sup> BAP, a potem hodowano na tym samym podłożu z dodatkiem 0,5 mg/dm<sup>3</sup> IAA i 0,2 mg/dm<sup>3</sup> BAP. Do inicjacji obu linii kalusa użyto jako eksplantatów korzeni pochodzących z siewek wyhodowanych *in vitro* z nasion dostarczonych przez ogród botaniczny w Tokio. Kalus tworzył się w świetle (fitotron, 40 μM/m<sup>2</sup>s).

Badaniom histologicznym poddawano kalusy z kolejnych pasaży, wykonując po 20 preparatów z każdego kalusa (skrawki oraz preparaty rozgniatane w glicerolu z wodą).

Badania plastydów przeprowadzono w mikroskopie świetlnym MB-30 PZO i w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM) – JEM 100 B.

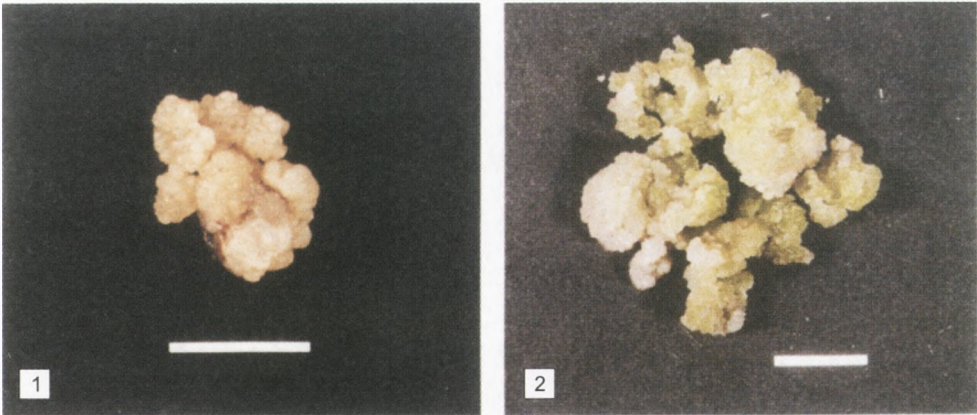
Przygotowanie materiału do badań w TEM przeprowadzono według następujących etapów:

- 1) utrwalanie: 3,5% roztwór aldehydu glutarowego w 0,13 M buforze kokakodylowym (pH = 7,0-7,5), czas utrwalania 1,5-2 godzin;
- 2) utrwalanie dodatkowe: 1% czterotlenek osmu w buforze kokakodylowym;
- 3) odwadnianie w etanolu o wzrastającym stężeniu (50-100%);
- 4) zatapianie w żywicy;
- 5) wykonanie ultracienkich skrawków za pomocą ultramikrotomu LKB III;
- 6) kontrastowanie skrawków octanem uranylu i cytrynianem ołowiu;
- 7) mikrofotografia elektronowa.

## 3. Wyniki

Obie linie kalusa charakteryzowały się strukturą gruzełkową (fot. 1, 2).

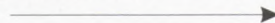
W kalusie kremowym występowały tylko dwa rodzaje plastydów: proplastydy (fot. 3, 4) i amyloplasty (fot. 5). Proplastydy wyróżniały się spośród innych plastydów bardzo zmiennym kształtem (owalne, ameboidalne, kubkowane i inne), słabo rozwi-

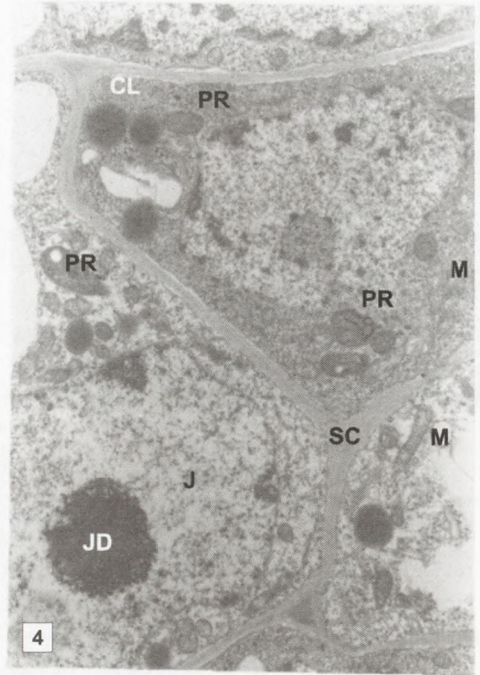
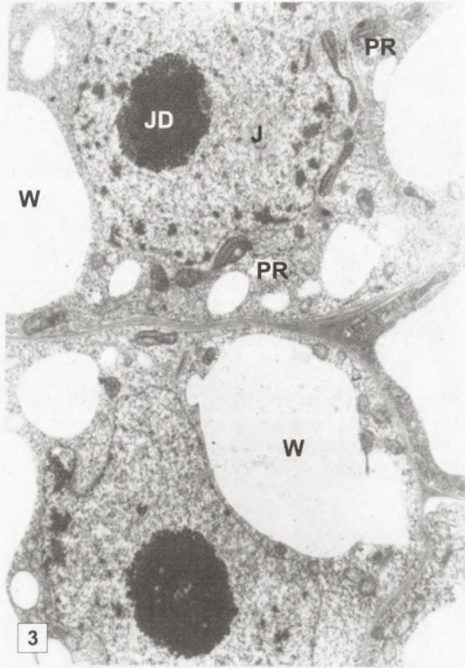


Fot. 1,2. *Plantago asiatica* L. – morfologia niemorfogennego kalusa, indukowanego na izolowanym korzeniu, skala 1cm: fot. 1 – linia kremowa, fot. 2. – linia zielona.

niętymi wewnętrznymi strukturami błonowymi oraz obecnością jedynie drobnych ziaren skrobi. Niektóre zawierały pęcherzyki w środku i przypominały mitochondria, ale różniły się od nich wyraźnie większą gęstością elektronową. Amyloplasty miały szczątkowe tylakoidy i były wypełnione różną liczbą zwykle bardzo dużych ziaren skrobi. W kalusach: zielonym i morfogennym oprócz proplastydów i amyloplastów (fot. 7-12), zbudowanych analogicznie jak w kalusie kremowym, występowały także chloroplasty (fot. 13,14). Zawierały one dobrze wykształcone podwójne błony tylakoidalne z granami lub bez gran. W stromie chloroplastów występowały ziarna skrobi i ciała lipidowe. Rozwój plastydów nie był synchroniczny – niekiedy w tych samych komórkach można było zauważyć różne fazy ich ontogenezy (fot. 6). Obserwowano także amyloplasty dzielące się (fot. 12).

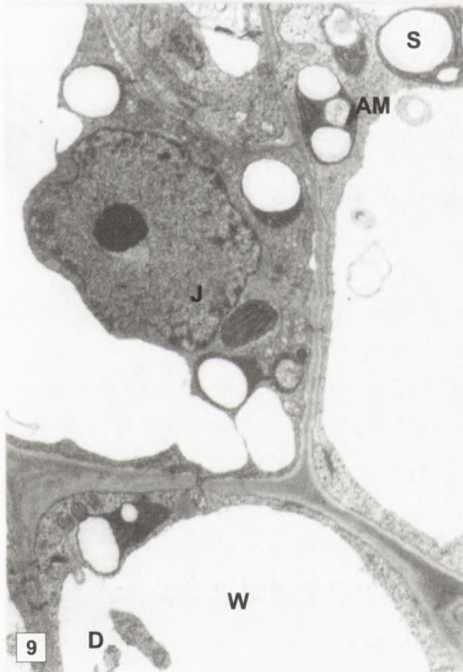
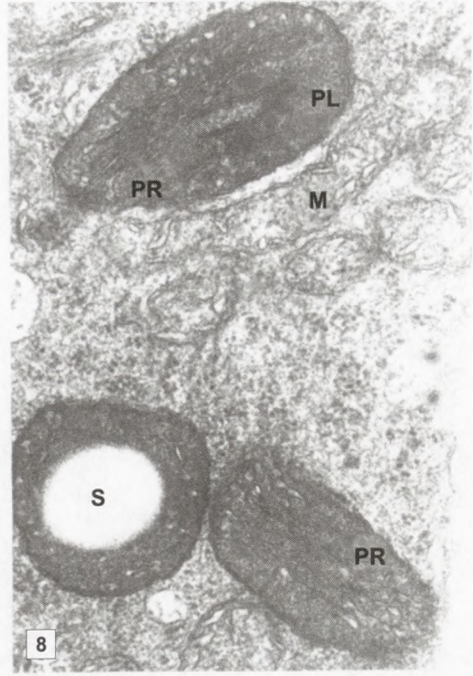
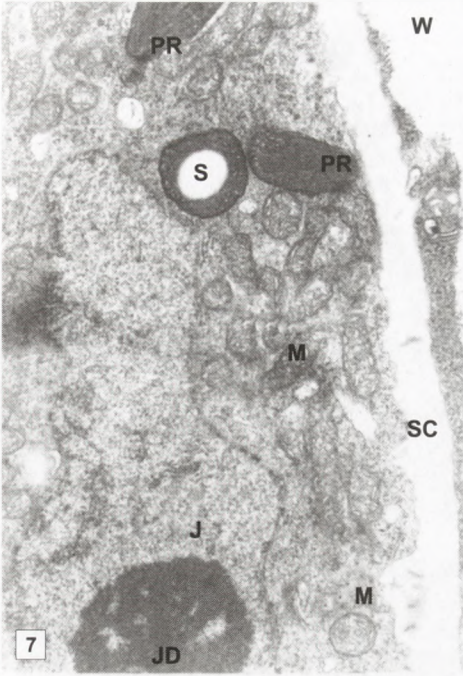
Fot. 3-14. Mikrofotografie elektronowe (TEM): AM – amyloplast; CH – chloroplast; CL – ciała lipidowe; D – degeneracja protoplastu; G – granum; J – jądro komórkowe; JD – jąderko; M – mitochondrium; O – otoczka chloroplastu; P – pęcherzyk; PL – plastoglobule (osmofilne krople); PR – proplastyd; S – skrobia; SC – ściana komórkowa; ST – stroma chloroplastu; T – błony tylakoidalne (tylakoidy); W – wakuola.



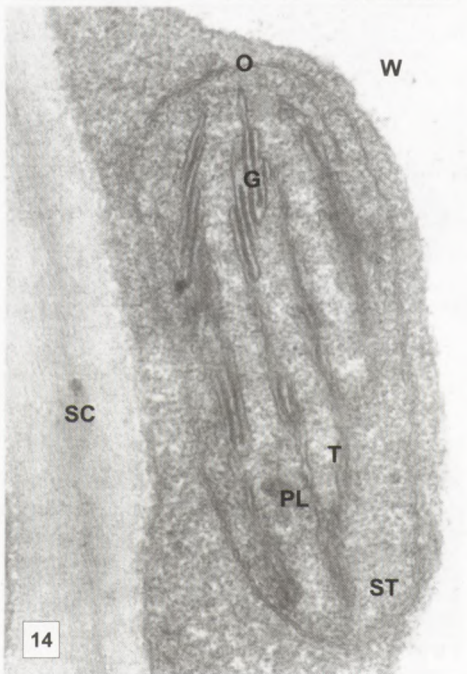
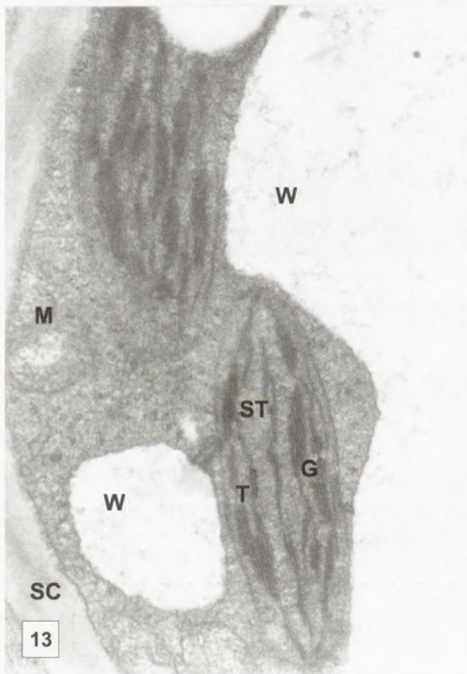
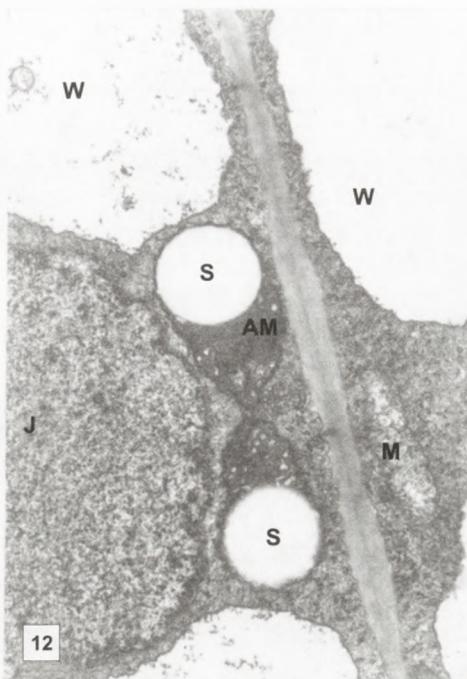
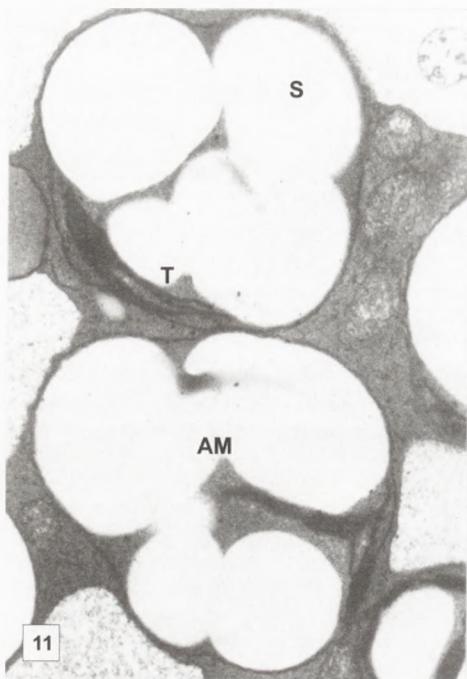


Fot. 3-5. Plastydy w kalusie kremowym: fot. 3, 4 –proplastydy, 10 000 ×, 15 000 ×; fot. 5 – amyloplasty, 7500 ×.

Fot. 6. Proplastydy i amyloplasty w kalusie wyhodowanym na MS wzbogaconym 0,2 mg/dm<sup>3</sup> IAA i 1 mg/dm<sup>3</sup> BAP, 7500 ×.



Fot. 7-14. Plastydy w kalusie zielonym: fot. 7 – proplastydy, 25 000 ×; fot. 8 – fragment fot. 6, 50 000 ×; fot. 9 – plastydy w silnie zwakuolizowanych komórkach, 10 000 ×; fot. 10 – amyloplast, 37 500 ×.



Fot. 11 – amyloplasty, 25 000 ×; fot. 12 – amyloplast dzielący się, 25 000 ×; fot. 13 – chloroplasty, 37 000 ×; fot. 14 – chloroplast, 75 000 ×.

#### 4. Dyskusja

Obecność proplastydów, amyloplastów i chloroplastów w tkance kalusowej opisywano wcześniej (5-10). Autorki po raz pierwszy badały te plastydy w komórkach kalusa babki azjatyckiej. Blackwell i wsp. (8) opisali występowanie etioplastów w białych kalusach topoli osiki hodowanych w ciemności. Takich form plastydów nie stwierdziliśmy w żadnym z badanych przez nas kalusów – były one hodowane na świetle. Nie obserwowaliśmy w plastydach agregatów fytoferrytyny ani ciał prolamelarnych charakterystycznych dla etioplastów (8). Amyloplasty w komórkach kalusa *Plantago asiatica* dzieliły się w sposób analogiczny jak to opisał Mingo-Castel i wsp. w bulwach ziemniaka (11) i Pacini ze wsp. w *Lolium perenne* L. (12). W badanych przez nas chloroplastach występowały niekiedy plastoglobule – ciała lipidowe (krople osmofilne). Według Sjolunda i Weiera (6) są to lipidowe rezerwy zanikające w czasie rozwoju chloroplastu. Według Simpsona i Lee (13) występują one w stromie większości plastydów: proplastydach, leuko-, chloro- i chromoplastach. Niezbędnym czynnikiem warunkującym tworzenie chloroplastów, jak wynika z literatury, są oprócz światła, cytokininy (5). Kalus zielony indukowaliśmy wzbogacając podłoże MS 2 mg/dm<sup>3</sup> BAP, ale stężenie 0,2 mg/dm<sup>3</sup> tej cytokininy wystarczyło do długotrwałej hodowli tkankowej zielonej linii kalusa *P. asiatica*.

#### 5. Wnioski

1. W kalusie *Plantago asiatica* wyhodowanym na świetle występują, jak w kalusach innych roślin, proplastydy i amyloplasty o budowie typowej.

2. Chloroplasty w kalusie zielonym nie odbiegają strukturą od chloroplastów opisanych w kalusach innych roślin.

#### Literatura

1. Yisheng T., (1996), *Zhoncaoyao*, 27, 296-298.
2. Makowczyńska J., Andrzejewska-Golec E., (2000), *Acta Soc. Bot. Pol.*, 69, 245-250.
3. Andrzejewska-Golec E., Makowczyńska J., Marek K., (2003), *Symposium on Electron Microscopy, Poznań, 2002*, *Pol. J. Pathol.*, 54, supl. 1, 5.
4. Andrzejewska-Golec E., Makowczyńska J., Marek K., (2003), *II Krajowy Kongres Biotechnologii, Łódź*.
5. Młodzianowski F., (1984), *Hodowla tkanek i komórek roślinnych*, red. Zenkteler M., 64-68, PWN, Warszawa.
6. Sjolund R. D., Weier T. E., (1971), *Amer. J. Bot.*, 58, 172-181.
7. Stetler D. A., Laetsch W. M., (1995), *Science*, 149, 1387-1388.
8. Blackwell S. J., Laetsch W. M., Hyde B. B., (1969), *Amer. J. Bot.*, 56, 457-463.
9. Israel H. W., Mapes M. O., Steward F. C., (1969), *Amer. J. Bot.*, 56, 910-917.
10. Thomas E., Konar R. N., Street H. E., (1972), *J. Cell. Sci.*, 11, 95-109.
11. Mingo-Castel A. M., Pelacho A. M., Felpe M. R., (1991), *Plant Sci.*, 74, 211-217.
12. Pacini E., Taylor P. E., Singh M. B., Knox R. B., (1992), *Ann. Botany*, 70, 179-188.
13. Simpson D. J., Lee T. H., (1976), *Cytobios*, 15, 139-147.