



You have downloaded a document from
RE-BUŚ
repository of the University of Silesia in Katowice

Title: O hodowli *in vitro* wycinków z łądygi rącznika (*Ricinus communis* L.) i wilczomlecza tyrlicza (*Euphorbia lathyris* L.)

Author: B. Wojciechowska, H. Dajnowicz-Kolbe, A. Workowska

Citation style: Wojciechowska B., Dajnowicz-Kolbe H., Workowska A. (1971). O hodowli *in vitro* wycinków z łądygi rącznika (*Ricinus communis* L.) i wilczomlecza tyrlicza (*Euphorbia lathyris* L.). "Acta Societatis Botanicorum Poloniae" (Vol. 40, no. 2 (1971) s. 227-241), DOI: 10.5586/asbp.1971.014



Uznanie autorstwa - Licencja ta pozwala na kopiowanie, zmienianie, rozprowadzanie, przedstawianie i wykonywanie utworu jedynie pod warunkiem oznaczenia autorstwa.



UNIwersYTET ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

O hodowli *in vitro* wycinków z łodygi rącznika (*Ricinus communis* L.) i wilczomlecza tyrlicza (*Euphorbia lathyris* L.)

B. WOJCIECHOWSKA, H. DAJNOWICZ-KOLBE, A. WORKOWSKA

Zakład Botaniki Instytutu Biologii Uniwersytetu Śląskiego,
Katowice, ul. Jagiellońska 28

B. Wojciechowska, H. Dajnowicz-Kolbe, A. Workowska, Institute of Biology, Silesian University, Katowice, Jagiellońska 28, Poland (Received: June 15, 1970).

In vitro culture of segment from shoots of *Ricinus communis* L.
and *Euphorbia lathyris* L.

Abstract:

The influence of certain factors on the growth and differentiation of the material investigated was analysed. Histo- and organogenesis are discussed together with the anatomy of the coalescence of the segments.

WSTĘP

Bogata literatura z zakresu kultur *in vitro* omawia procesy rozwoju tkanek i organów oraz uwzględnia mechanizm ich zrastania się ze sobą. Wyniki badań przeprowadzonych przez Camusa (1943—47), Camusa i Gauthereta, Roppe (1948) cytował w krajowej literaturze między innymi Rodkiewicz (1952), który śledził procesy zachodzące przy zrastaniu się tkanek marchwi. Podczas analizowania czynników odpowiedzialnych za indukowanie procesów histogenezy w zrastających się tkankach lilaka Wetmore i Sorokin (1955) zwrócili uwagę na możliwości zastąpienia substancji wytwarzanych przez rośliny w stożkach wzrostu pędu przez czynniki chemiczne. Stwierdzono, że działanie auksyn można regulować wprowadzając w odpowiednim stosunku adeninę-A, kinetynę-K oraz niektóre cukry (Wetmore i Sorokin 1955; Howell i Skoog 1955; Skoog i inni 1967; Rogozińska 1968; Torrej 1958).

Jednak okazało się, że niektóre czynniki chemiczne są mało specyficzne w działaniu, a hodowane tkanki reagują inaczej niż tkanki i kalusy testowe marchwi, tytoniu itd. (Olszewska i inni 1957).

Na procesy wzrostu i rozwoju kalusa i wycinków regulujący wpływ wywierają również czynniki zewnętrzne (Słabędzka-Szweykowska 1952; Gajewski 1954, Renert 1965).

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono danych o hodowli *in vitro* tkanek rącznika. W roku 1957 Montant przedstawił wyniki hodowli tkanek korzenia *Euphorbia characiens* na pożywce Knopa z dodatkiem IAA w stężeniu 1 mg/l pożywki, oraz tiaminy, mezoinozytu, kwasu nikotynowego i biotyny. Do pożywki dodano penicyliny. Było to konieczne ze względu na obecność endobakterii w tkankach wilczomlecza.

Punktem wyjściowym niniejszych badań były wyniki uzyskane podczas szczepienia wegetatywnego między rącznikiem i wilczomleczem (Wojciechowska w druku).

Celem podjętej pracy było sprawdzenie zdolności regeneracyjnych uszkodzonych tkanek i porównanie wycinków hodowli *in vitro* z wynikami uzyskanymi uprzednio *in vivo*.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Materiał i metody pracy

Materiał do badań stanowiły lodygi *Ricinus communis* L. i *Euphorbia lathyris* L. W celach porównawczych użyto również lodygi *E. marginata* Pursh i *E. platyphyllos* L. Rośliny hodowano w wazonach. Nasiona otrzymano z Ogrodów Botanicznych w Bremie, w Halle, z Ogrodu Instytutu Roślin Leczniczych w Poznaniu i Ogrodu Farmakognozji A. M. w Łodzi.

Wycinki do hodowli *in vitro* pobierano z roślin rącznika tuż przed kwitnieniem. Przed zabiegiem, lodygi i ogonki liściowe sterylizowano zewnętrznie. Narzędzia i stół odkażano etanolem, a następnie naświetlano przez 30 minut lampą kwarcową. Łodygi skrawano żyłką. Z łodyg wilczomlecza odcinano części szczytowe, około 4 cm długie i gęsto ulistnione, usuwano stożek wzrostu pędu wraz z przylegającą strefą o długości równej około 0,8 mm i delikatnie oddzielono liście. Siewki rącznika użyto w stadium 4—7 liści. Wykorzystano odcinki o długości 1,5—2 cm. Ogonki liściowe rozcinano wzdłuż na 4 części i poprzecznie co 0,5 cm.

Fragmety łodyg dzielono na krążki o wysokości 3—5 mm. Następnie część przecinano wzdłuż średnicy na połowy lub ćwiartki. Epidermy nie usuwano. Na płytkach Petriego układano po 2, 3, 4, lub 6 eksplantatów, a do probówek ze skośnie zestaloną pożywką po 2. W każdej serii wyszczepiano około 60 eksplantatów.

W pierwszej serii hodowano wycinki pobrane z łodygi jednego gatunku. Celem stwierdzenia, czy w hodowli *in vitro* dojdzie do zrośnięcia się tkanek wycinków pobranych z jednej łodygi wykonano doświadczenia w tym zakresie. Kontynuując badania nad histologiczną reakcją przyraną w miejscu połączenia się tkanek zrazą i podkładki przeprowadzono

hodowle wycinków ręcznika, na które nałożono wycinki z łądygi wilczomleczka (rys. 1). Ponieważ w czasie badań *in vivo* zauważono, że wyniki doświadczenia zależą od stadium rozwojowego rośliny, hodowano również wycinki z części podłścieniowej młodych siewek ręcznika.

Uwzględniono wpływ światła, temperatury, pory roku oraz niektórych składników pożywki (sole mineralne w różnym stężeniu, substancje wzrostowe, witaminy i wyciąg z drożdży). Stosowano pięć pożywek:

- A — pożywka mineralna White'a z dodatkiem ekstraktu drożdżowego wg R u g e (1965),
- B — czterokrotnie stężona pożywka mineralna White'a z dodatkiem ekstraktu drożdżowego wg R u g e (1955),
- C — pożywka (B) zamiast wyciągu z drożdży uzupełniona mikroelementami, witaminami i substancjami wzrostowymi (adenina-40 mg i kwas indoliloctowy-IAA 2,0 mg na litr pożywki),
- D — skład jak w pożywce C z dodatkiem 1 mg kinetyny-K,
- E — skład jak w pożywce D (adenina w ilości 20 mg).

Pożywki uzyskano z Katedry Fizjologii Roślin U.Ł.

Temperaturę po pierwszych doświadczeniach regulowano w granicach 28—30°C w latach 1962 i 1963, oraz 32—34°C w latach 1963—1965. Kultury obserwowano w ciągu 2 miesięcy.

W okresie od maja do września uzyskiwano z reguły kultury sterylne, w pozostałych miesiącach procent zainfekowanych eksplantatów wynosił mniej niż 30.

Przy wyborze materiałów do badań anatomicznych kierowano się makroskopowo widocznymi zmianami w strukturze i rozmiarach eksplantatów. Materiały konserwowano w mieszaninie alkoholu, gliceryny i wody (1 : 1 : 1). Skrawki o grubości 15—20 μ przygotowano przy pomocy mikrotomu zamrażającego, a część przy pomocy żyłki. Wykonano preparaty trwałe. Niektóre przechowywano bezpośrednio w odczynnikach na tłuszcze, drzewnik, celulozę, pektyny. Odczynniki przygotowano wg powszechnie znanych przepisów (L a n g e r o n 1949, F i l u t o w i c z, K u z d o w i c z 1951). Ilustracje wykonano przy pomocy aparatu rysunkowego.

OMÓWIENIE WYNIKÓW DOŚWIADCZEŃ

Na pożywce mineralnej White'a wzrost wycinków był nikły i łącznie z cienką warstwą kalusa nie przekraczał 20% pierwotnej objętości.

U wilczomleczki rozwijały się nieliczne włoski przyranne.

Na eksplantatach z łądygi ręcznika dochodziło w tych warunkach do rozrastania się niektórych komórek kory pierwotnej i powiększania się lub rozrywania komórek skórki. Zgodnie ze znaną małą aktywnością mezystematyczną skórki, sporadycznie wystąpiły w niej podziały.

Po znacznym powiększeniu się rozmiarów odróżnicowanych komórek miększu kory pierwotnej lub kolenchymy, zakładały się ściany dzielące

komórkę macierzystą w kilku płaszczyznach. Prowadziło to do nierównomiernego rozrastania się wycinków i tworzenia pseudopączków (rys. 2). Również i na wycinkach pobranych z ogonków liściowych rącznika wystąpiły podobne procesy, ale podziały były mniej liczne, a pseudopączki małe.

Podczas dzielenia lodyg na segmenty, uszkodzono część komórek, które uległy nekrozie. Ich plazmatyczna treść zestalała się, łączyła w drobne i grubsze ziarnistości, a ściany stopniowo się rozpuszczały.

Na pożywce B bujniej rozwijały się wycinki rącznika. Najpierw pojawił się niepozorny białawy i szybko żółciejący puszysty kalus. Po kilku dniach wycinki rącznika rozrastały się nieregularnie, a kalus tworzył szkliste płyty i brodawki (fot. 1). U wilczomleczy tkanka kalusowa rozwijała się znacznie słabiej niż u rącznika w postaci równomiernie rozwiniętego, białego zielonego pierścienia. Na obwodzie był on zawsze puszysty i matowy (fot. 2). Stąd od pierwszych dni hodowli makroskopowo można było zauważyć różnice w ukształtowaniu tkanek na wolnej powierzchni wycinków.

W stronę pożywki kalus narastał zawsze intensywniej jako prawie bezbarwna lub kremowa tkanka obficie u rącznika niż u 3 badanych gatunków wilczomleczy.

Optimum rozwoju eksplantatów najczęściej przypadło na 3 i 4 tygodnie hodowli. Później tkanki brunatniały i przeniesione na nowe podłoże nie przejawiały tendencji do dalszego rozwoju. Podobnie zachowywał się kalus ścięty z górnej powierzchni eksplantatów.

Na pożywce C zawierającej IAA w ilości 2 mg/l i A w ilości 40 mg/l znacznie powiększała się objętość wycinków i obficie niż na pożywce B narastał kalus. Z reguły 3 lub 4 wycinki rosły szczególnie aktywnie. Tak

Fot. 1. Pierwsze stadium rozwoju kalusa na dopowietrzonej stronie wycinka lodygi rącznika

First stage of callus development on the aerial side of the *Ricinus* shoot segment

Fot. 2. Pierwsze stadium rozwoju kalusa na dopowietrzonej stronie wycinka z lodygi wilczomlecza tyrlicza

First stage of callus development in the aerial side of the *Euphorbia* shoot segment

Fot. 3. Liść rozwijający się na wycinku z lodygi rącznika

A developing leaf from *Ricinus* shoot segment

Fot. 4. Korzeń wyrastający z wycinka wilczomlecza tyrlicza

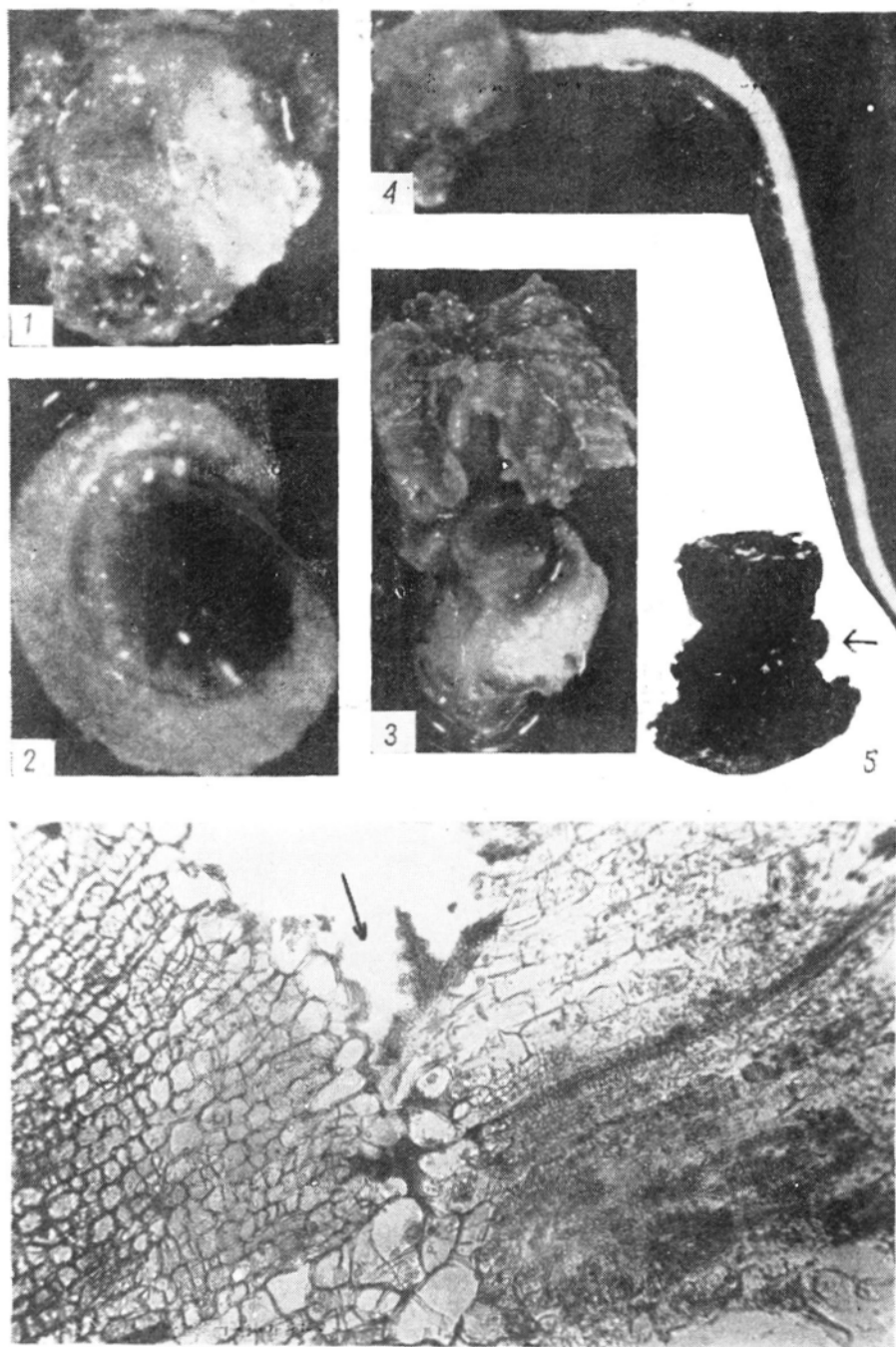
A developing root from *Euphorbia* shoot segment

Fot. 5. Warstwa kalusa między wycinkami rącznika i wilczomlecza

A callus layer between the *Euphorbia* and *Ricinus* segments

Fot. 6. Strefa zrostu między tkankami rącznika i wilczomlecza

A growth zone between the tissues from *Ricinus* and *Euphorbia*



Fot. 1—6

u rącznika, jak wilczomleczka tyrlicza rozwinęły się korzenie. Optimum rozwoju eksplantatów przypadało na 18—24 dzień. Pierwsze punkty nekrotyczne wystąpiły w piątym tygodniu hodowli. Temperatura wynosiła 28°C i w powtórzeniu doświadczenia 30°C.

Celem następnych doświadczeń były próby sprawdzenia wpływu kinetyny (K) wobec IAA i A zawartych w pożywce w stężeniu jak wyżej. Kinetynę dodano w ilości 1 mg/l. Temperatura była regulowana w granicach 28—30°C i 32—34°C. Dni były słoneczne. Na pożywce (D) po czterech tygodniach hodowli uzyskano silny rozwój wycinków rącznika, które wyglądały jak nieforemne bryłki. Wcześniej niż na innych pożywkach wyróżnicowały się pączki i rozwijały liście. Blaszki liści osiągnęły około 2,5 cm średnicy (fot. 3). U rącznika później i rzadziej niż u wilczomleczka tyrlicza powstawały korzenie. Rosły one wolno i nie przekraczały 1,5 cm dł. W tych warunkach u *Euphorbia lathyris* nie dochodziło do wytwarzania pączków, silnie natomiast rozwijały się korzenie. Z reguły jednej z nich wyrastał szybciej (fot. 4) i przy 3,5 cm posiadał już kilka korzeni bocznych. Długość niektórych dochodziła do 16 cm.

Rys. 1. Zrastające się ze sobą wycinki rącznika i wilczomleczka
Concrescence of segments from *Ricinus* and *Euphorbia*

Rys. 2. Pseudopączki u rącznika
Buds from *Ricinus*

Rys. 3. Wycinek z łodygi rącznika
a — wzrost elongacyjny komórek perycyklu; b — warstwa merystematyczna; c — włókna pochodzenia perycyklicznego
Segment from *Ricinus* shoot
a — elongative growth of pericycle cells; b — meristematic layer; c — the fibers originating from pericycle

Rys. 4. Schemat wycinka z łodygi rącznika
a — warstwa merystematyczna; b — warstwa merystematyczna w odróżnicowanym drewnie (c); d — rdzeń; e — nowy ośrodek merystematyczny w zewnętrznej części kalusa
A scheme of a segment from *Ricinus* shoot
a — meristematic layer; b — meristematic layer from dedifferentiated wood (c); d — pith; e — new meristematic centre in external part of the callus

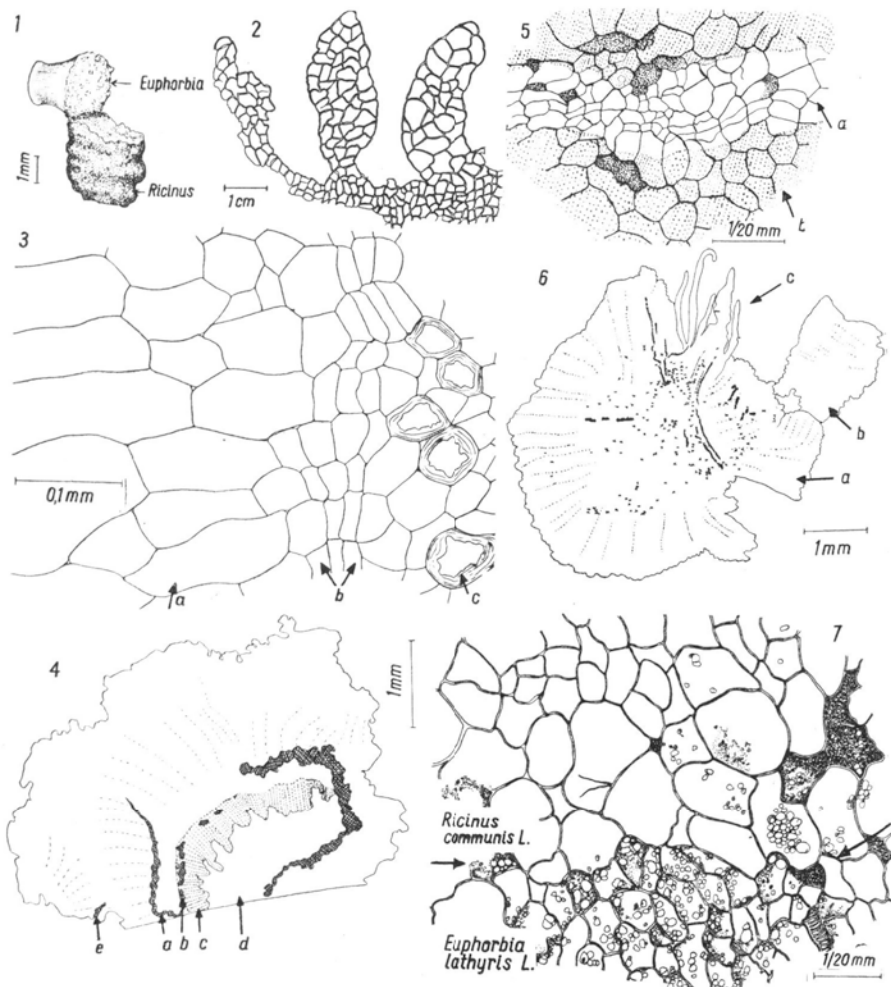
Rys. 5. Warstwa merystematyczna (a). Preparat w czerwieni rutenowej. Komórki zabarwione zakropkowano
Meristematic layer (a). Ruthenium red preparation. The stained cells are shaded

Rys. 6. Wycinek łodygi rącznika (a) z przyrośniętym wycinkiem wilczomleczka tyrlicza (b), c — rozwijający się pączek boczny
(Zaznaczono lokalizację cewek i kryształów szczawianu wapnia (x))
A segment of *Ricinus* shoot (a) with concrescenced *Euphorbia* segment (b), c — developing lateral bud
(The localization of tracheids and of calcium oxalate crystals is marked (x))

Rys. 7. Linia graniczna między zrastającymi się tkankami rącznika i wilczomleczka
The border line between the coalescence of *Ricinus* and *Euphorbia* tissues

Zmniejszenie stężenia A z 40 do 20 mg/l (pożywka E) zahamowało rozwój kalusa, szczególnie na słabiej rosnących wycinkach wilczomleczy, a indukowało ryzogenezę na wycinkach ręcznika. Liczne związki korzonków były ustawione w jednym okółku na stronie dopowietrznej.

Na pożywce C, D i E w pierwszym rzędzie odróżnicowaniu i silnemu rozrostowi podlegały komórki kory pierwotnej oraz nieco później perycyklu i rdzenia. Wzrostem elongacyjnym były objęte ściany promieniowe komórek. Stopniowe rozciągania się komórek wzdłuż promieni powodowało wielokrotne zwiększenie objętości eksplantatów. Jednocześnie na powierzchniach obydwu wycinków — dopowietrznej i dopożywkowej — roz-



Ryc. 1—7

wijała się warstewka kalusa. Część silnie wydłużonych komórek zmieniała kierunek wzrostu i odchyłała się ku powierzchni dolnej lub górnej eksplantatów. Szczytowe części tych komórek rozdymały się buławkowato mieszcząc w sobie dużą wodniczkę i jedną lub dwie grupy plastydów. Blisko części szczytowej leżało również duże jądro. Na ryc. 3 wskazano kilka komórek perycyklu w początkowym stadium wydłużania (rys. 3a). Przylegają one do warstwy merystematycznej (rys. 3b). Podlegające od różnicowaniu włókna perycykliczne można zlokalizować biorąc pod uwagę szerokość ściany komórkowej (rys. 3c).

Kalus produkowany przez koronę rdzeniową składał się z komórek o wyraźnie mniejszych wymiarach, które zawierały drobne plastydy. Na wycinkach z łodygi rącznika hodowanych przez 5 tygodni na pożywce D następowało formowanie się wtórnych ognisk merystematycznych. Zgodnie ze spostrzeżeniami Rodkiewicza (1952) oraz Wetmore i Sorokina (1955) pierwszy szereg komórek inicjalnych zakładał się u podstawy kalusa i tworzył łuk. Łuk ten przebiegał mniej więcej równolegle do linii perycyklu, zaginał się u brzegów wycinka, mijał miazgę i półkoliście przecinał rdzeń. Następne gniazda merystematyczne powstawały w obwodowych częściach kalusa. Miało to miejsce wtedy, kiedy na wycinku rącznika hodowano wycinek wilczomleczka. Warstwy komórek inicjalnych przedstawiono na schematyzowanym rysunku 4 oraz w dużym powiększeniu na rys. 3 i 5. Równocześnie dochodziło do zakładania wtórnych drobnych gniazd merystemów w drewnie. Początkowo miazga nie brała jeszcze udziału w procesach regeneracyjnych w takim stopniu, aby to można stwierdzić histologicznie. W późniejszym okresie, w wyniku dzielenia miazgi zostały odłożone szeregi drobnych, niezróżnicowanych komórek w stronę łyka. Przyrost w stronę drewna od razu różnicował się w cewki, naczynia i miękisz przewodzący.

Na wycinkach rącznika hodowanych na pożywce D szybko rozwijały się pączki otulone liśmi (rys. 6). Do ich podstawy dochodziły sznury wiązek przewodzących oraz rozrzucone w miękiszu zgrupowania cewek. Błony cewek miały z reguły siateczkowate zgrubienia. W sąsiedztwie intensywnie dzielących się i rosnących komórek, tuż pod wykształconym pączkiem bocznym oraz blisko części naczyniowej wiązek znajdują się liczne druzdy szczewianu wapnia. Podobną lokalizację stwierdzono w tkankach rącznika po szczepieniu wegetatywnym, gdzie „bariery szczawianowe” stanowiły granicę między tkankami starymi a przechodzącymi od stadium podziałów do różnicowania się (Wojciechowska w druku). Nie są to jedyne obserwacje z tego zakresu, a masowe występowanie kryształów szczawianu wapnia było już w literaturze dyskutowane.

Analiza stosunków w badanym obecnie materiale zdaje się wskazywać, że pojawienie się tych kryształów jest skorelowane z przemianami w chemizmie ścian komórkowych, a ściślej z ich inkrustacją substancjami wykrywaniem przy pomocy fluoroglucony i 48% H_2SO_4 .

Reakcje histochemiczne przeprowadzone w celu poznania składu ścian komórkowych wykazały bardzo interesujące zjawisko. W wyniku reakcji na drzewnik (floroglucyna z 48% kwasem siarkowym), uzyskano jasne, czerwonomalinowe zabarwienie komórek merystematycznych. Podobnie były zabarwione młode naczynia metaksylemu. Elementy protoksylemu, część komórek kalusa i niektóre komórki wycinków, np. odróżnicowujące się komórki zwarciocy albo komórki uszkodzone w czasie skrawania, były czerwobrunatne. Takie zabarwienie jest związane z obecnością domieszek (tłuszcze, pektyny, substancje gumowate). Jak zauważono na starszych eksplantatach drzewnik występuje też w komórkach kalusa przylegających do warstwy merystematycznej, oraz wszędzie tam, gdzie komórki wchodzą w stadium podziałów i różnicowania w elementy przewodzące (cewki i naczynia). Obecność drzewnika u podstawy luźno strukturalnego kalusa jest uzasadniona. Z badań Rodkiewicza (1952) wynika, że drzewnik występował na wycinkach z korzenia marchwi w komórkach grubościennych zlokalizowanych na granicy między starymi i nowowytworzonymi tkankami. W rejonie działalności kambium warstwa komórek grubościennych znikła. Nie wiadomo jednak, jakie były wyniki reakcji na drzewnik w komórkach inicjalnych.

Lokalizacja związków pektynowych wykazała, że w największych ilościach można je wykryć w ścianach niektórych komórek kalusa. Stanowią bowiem główny składnik ściany w okresie wzrostu elongacyjnego. Natomiast warstwa komórek inicjalnych prawie nie zawiera związków pektynowych.

Ze względu na nietypowe wybarwienie treści komórek inicjalnych oraz minimalną grubość ścian komórkowych, warstwa merystematyczna zostaje jeszcze bardziej wyeksponowana z otaczającego ją tła. Np. w czerwieni rutenowej ściany komórek wycinków i kalusa są zabarwione intensywnie cyklamenu, podczas gdy ściany komórek dzielących się są słabo różowe. Odłożone bezpośrednio po cytoklinezie w ogóle nie zostają zabarwione, a treść komórkowa jest żółta (rys. 5a). Stąd należy przypuszczać, że w bardzo młodych ścianach brak substancji pektynowych, które pojawiają się po zakończeniu pewnej fazy podziału albo wyżej wymieniony odczynnik reaguje tylko z niektórymi substancjami pektynowymi.

W odczynnikach na tłuszcze zawsze intensywniej wybarwiają się tkanki wilczomlecza tyrlicza niż tkanki rącznika. U rącznika, jasny, różowoczerwony kolor w roztworze Sudanu III i IV mają ściany wszystkich komórek merystematycznych, tak położonych w głębi wycinków, jak i na obwodzie kalusa. Wyraźnie słabiej reagują ściany komórek miazgi.

Regeneracja histologiczna na wycinkach wilczomleczy w hodowli *in vitro* miała przebieg bardzo podobny jak we wspomnianych badaniach *in vivo*. Z reguły na uszkodzonej powierzchni rozwijały się w kilku warstwach komórki tkanki o charakterze przejściowym między korkiem przyrannym a tkanką pośrednią. Komórki były drobne, ustawione w promie-

niste szeregi, raczej grubościennie i bardzo intensywnie reagowały z odczynnikami na tłuszcze. W ścianach wystąpiły nieznaczne domieszki drzewnika. Najsilniej barwiła się warstwa podstawowa, granicząca z tkankami wycinka. Równocześnie z rozwojem tkanki powierzchniowej rozrastały się komórki zlokalizowane w głębi eksplantatów. Reakcją zostawał objęty wycinek o szerokości wyznaczonej przez tkankę rozrastającą się na uszkodzonej powierzchni. Z perycyklu wyrastały w tym miejscu zawiązki korzeni zbudowane z drobnych komórek wypełnionych plazmą. Tworzyły one ciemne smugi przecinające korę pierwotną. U ich podstawy rozrastało się łyko, miazga i drewno. Miazga tworzyła linię falistą, a elementy drewna często zmieniały kierunek wzrostu. Powstawały cewki poprzeczne. Komórki rdzenia nieco się rozrastały. Różnicowały się w tkankę pośrednią między kalusem a korkiem przyrannym (jeżeli były uszkodzone) albo przeróżnicowały się w krótkie cewki. W przypadku masowego przeróżnicowywania komórek powstawał słup elementów przewodzących prawie całkowicie wypełniający rdzeń.

Jeżeli wycinek z lodygi wilczomleczka tyrlicza położono nie na podłożu agarowym, a na wycinku z lodygi ręcznika, wtedy między różnogatunkowymi tkankami wytwarzały się komórki zrostowego kalusa (rys. 7 i fot. 6). Na linii granicznej znajdowała się bardzo wąska warstewka ziarnistej substancji zabarwionej zielono-biało, oraz resztki ścian komórkowych. Na rys. 7 i fot. 6 granicę między obcogatunkowymi wycinkami wskazano przy pomocy strzałek.

Komórki tkanki pośredniej wytworzonej przez ręcznik są większe i prawie puste optycznie. Ściany są cienkie i słabo się barwią w roztworze Sudanu III. Komórki o największych rozmiarach stykają się bezpośrednio z komórkami wycinka wilczomleczka. Te ostatnie z reguły są drobne i wypełnione ziarnami skrobi, kroplami tłuszczu i ziarnistą cytoplazmą. Wszystkie komórki wycinka wilczomleczka, łącznie z naczyniami intensywnie się barwią w roztworze Sudanu I lub IV. Ich charakterystyczną cechą stanowi bardzo mała tendencja do podziałów i znaczna łatwość od różnicowania się i bezpośredniego łączenia się z obco gatunkowymi tkankami. Na rys. 7 można zobaczyć zaledwie kilka komórek kalusa wytworzonych przez tkanki wilczomleczka. Są one zlokalizowane przy strzałkach.

Na linii granicznej między różnogatunkowymi tkankami brak komórek korka przyrannego, a więc tkanki zrosły się ze sobą.

Jako kryterium pełnego zrostu między dwoma wycinkami przyjmuje się nie tylko połączenie przez kalus, ale również wytworzenie połączenia między tkankami przewodzącymi obydwu wycinków. Stanowisko takie winno być przedyskutowane ponieważ różnicowanie się komórek jest kolejnym etapem reakcji regeneracyjnej i zależy od bardzo wielu czynników. Główną rolę w indukowaniu tkanki przewodzącej odgrywają substancje wzrostowe, składniki mineralne oraz cukrowce. Ważny jest kierunek wnikania substancji i jej stężenie. Na różnicowanie tkanki naczy-

niowej wywierają pewien wpływ nieznanne substancje produkowane przez pączek albo obecność tkanki przewodzącej w jednym z eksplantatów (rys. 1).

Przy rozpatrywaniu możliwości i sposobów zrastania się wycinków uderzał brak wymagań w stosunku do składników pożywki. Na pożywkach B—E wycinki rącznika i wilczomlecza zrastały się ze sobą po 12 do 16 dniach. Kalus rozwijał się intensywnie i prędzej niż na wycinkach hodowanych osobno. Procesy rozwoju i zrastania się przebiegały wolniej w przypadku łączenia dwóch wycinków z lodygi rącznika. Na żadnej pożywce nie stwierdzono zrostu między wycinkami z lodygi wilczomlecza.

DYSKUSJA

Na podstawie przeprowadzonych badań należy przypuszczać, że znaczne zdolności regeneracyjne rącznika ujawniają się dopiero w późniejszych stadiach rozwoju rośliny. Wycinki pobrane z roślin, które rozwinęły pierwsze międzywęzła rosły słabo i wytworzyły cienką warstewkę kalusa. Rośliny szczepione wegetatywnie również zrastały się dopiero po osiągnięciu fazy kwitnienia. Podobne rezultaty w badaniach *in vivo* uzyskał K u ż d o w i c z (1954) i M i c h n i e w i c z (1956) szczepiąc rośliny z rodziny *Solanaceae*.

Analizując wpływ niektórych czynników zewnętrznych na rozwój wycinków zauważono zależność od cyklu rocznego. Aktywny rozwój był związany z miesiącami ciepłymi i słonecznymi (koniec kwietnia do końca sierpnia). Później procesy wzrostowe i morfogenetyczne ulegały zahamowaniu. Po wyraźnym, pierwszym etapie rozplemu, na wycinkach pojawiały się punkty nekrotyczne. Tkanki brunatniały i przeniesione na nowe podłoże zamierały.

Czas aktywnego rozwoju wycinków nie przekraczał pięciu tygodni. W miesiącach od stycznia do kwietnia, przyrost kalusa był nieznaczny, a na wycinkach pojawiały się mikroorganizmy częściej niż w innej porze roku. O istnieniu związku między rozwojem wycinków lub kalusów a cyklem rocznym istnieją liczne dane w piśmiennictwie.

Wyniki hodowli w znacznym stopniu zależały też od nasłonecznienia i temperatury, w której wykonywano doświadczenia, i nie zawsze były one porównywalne pod względem przyrostu masy kalusa. Najlepsze wyniki uzyskano przy 30—33° C. Podniesienie temperatury do 34° C nie wpłynęło jednak w sposób widoczny na rozwój wycinków. Stąd wydaje się, że 34° C nie stanowi jeszcze górnej granicy rozwoju dla tych tkanek, ponieważ na obwodzie kalusa nie dochodziło do odkładania skorkowaciałych i drobnych komórek, których pojawienie przyjmuje się jako objaw starzenia się hodowli.

Bardzo różnie kształtują się też wymagania odnośnie do rodzaju i natężenia światła.

Dla rozwoju tkanek z łodygi rącznika i wilczomleczy potrzebne jest światło dosyć silne i rozproszone. W tygodniach pochmurnych rozwój hodowli był wyraźnie zahamowany.

Rozpatrując wpływ podłoża stwierdzono, że 4-krotnie stężona pożywka mineralna White'a, zawierająca wyciąg z drożdży, okazała się mało przydatna do hodowli wycinków rącznika i wilczomleczy w produkcji kalusa. Natomiast proces zrastania się tkanek przebiegał na niej stosunkowo prędko. Najprędzej zrastały się ze sobą wycinki pobrane z łodygi *Euphorbia* i *Ricinus*, co wskazuje na wyraźną wzajemną tolerancję immunologiczną. Odpowiedzialny za stymulowanie reakcji zrostowych może się okazać dwuester forbolu. Jest to związek o działaniu kokarcinogennym wykryty u *E. lathyris* przez H e c k e r a (1968).

Na pożywkach White'a uzupełnianych substancjami wzrostowymi uzyskano makroskopowo widoczne minimum czterokrotne powiększenie objętości wycinków i znaczny przyrost kalusa. Kalus narastał na obydwu stronach wycinków, przy czym przyrost w stronę pożywki był większy i morfologicznie mniej zróżnicowany. G a j e w s k i (1954) tłumaczy to biegunowością i polarnym transportem substancji wzrostowych.

Na stosowanych pożywkach nie uzyskano jednak kalusa zdolnego od trwałego i nieograniczonego wzrostu. Przyczyny takiego stanu rzeczy mogły być związane z przeszczepieniem na nowe podłoże zbyt małych wycinków, pobranych tylko ze strony dopowietrznej. Być może kalus ścinało w nieodpowiednim okresie i za bardzo powierzchownie. Negatywne wyniki przy transplantacji kalusa mogą także wynikać z dziedzicznych właściwości badanych tkanek. Natomiast wydaje się, że efekty organogenetyczne były w głównej mierze regulowane stężeniem IAA, K i A. W obecności IAA (2 mg/1l) i A (40 mg/1l pożywki), na wycinkach rącznika i wilczomleczy rozwijały się korzenie. Wprowadzeniem kinetyny w ilości 1 mg/1l pożywki wywołano tylko u rącznika zahamowanie ryzogenezy i indukowanie rozwoju pączków i pseudopączków.

Zmniejszenie ilości adeniny do 20 mg/1 l pożywki spowodowało zahamowanie rozwoju pączków, a stymulację ryzogenezy u rącznika. Wycinki wilczomlecza nie reagowały na zmianę stężenia tej zasady purynowej.

Uzyskane wyniki wskazują, że tylko tkanki rącznika reagują podobnie jak tkanki tytoniu (S k o o g 1950, 1955 cyt. za O l s z e w s k ą i innymi (1957) i R o g o z i ń s k ą (1961), dając dodatkowy atut tym, którzy uważają, że rozwój liści i korzeni wynika z synergicznego działania adeniny, kinetyny i kwasu indoloctowego dodanych do pożywki w określonym stosunku.

Z histologicznego punktu widzenia można uważać, że IAA dodany do mineralnej pożywki White'a w pierwszym rzędzie stymulował wzrost elongacyjny miękiszu u rącznika. Jednak tkanka mięksiszowa z łodygi wilczomlecza nie wykazała takiej reakcji w wyżej omówionych warunkach. Należy też przypuszczać, że rozwój warstwy merystematycznej

w kalusie był indukowany tak obecnością IAA, jak i K, ponieważ tak rola auksyn, jak i kinetyny polega na stymulowaniu podziałów komórkowych (Skoo g i Miller 1957 oraz Olszewska i inni 1957).

Ogólnie panuje pogląd, że bardzo młode ściany komórkowe są zbudowane z protopektyn i hemicelulozy, później także zawierają celulozę.

Wykonane obecnie reakcje histochemiczne wykazały, że w początkowych stadiach rozwoju ściany komórkowej, można w niej wykryć obecność substancji, które silnie reagują z floroglucyną i 48% H_2SO_4 oraz z Sudanem III lub IV. W tych odczynnikach barwią się wszystkie komórki merystatyczne. W okresie wzrostu elongacyjnego ściany zawierają nieznaczne ilości substancji tłuszczowych, są pozbawione związków reagujących z floroglucyną i 48% H_2SO_4 , a ich głównym składnikiem są związki pektynowe. Ściany starszych komórek kalusa posiadają już złożony skład chemiczny, stąd wyniki reakcji barwnych są mniej czyste. Szczawian wapnia w postaci krystalicznej najprawdopodobniej zostaje odłożony w czasie różnicowania komórek w elementy przewodzące, a więc podczas odkładania ligniny. Tak można tłumaczyć obecność tych kryształów w komórkach otaczających zgrupowania cewek i naczyń.

STRESZCZENIE

Przeprowadzono badania *in vitro* nad wzrostem, organogenezą i anatomią zrostu wycinków pobranych z łodygi rącznika i wilczomlecza tyrlicza.

Badano aktywność działania kwasu indolooctowego (IAA), kinetyny (K) i adeniny (A) dodanych do czterokrotnie stężonej pożywki mineralnej White'a. Zauważono, że działanie IAA i K można korelować zmieniając stężenie A.

Stwierdzono, że przyrost masy kalusa zależy w większym stopniu niż organogeneza od takich czynników, jak: temperatura, nasłonecznienie i pora roku. Ani skład pożywki, ani wspomniane wyżej czynniki zewnętrzne nie wywierają większego wpływu na proces zrastania się różnogatunkowych wycinków. Obydwa gatunki charakteryzuje znaczna tolerancja immunologiczna na soki ustrojowe partnera doświadczenia. Wydaje się, że obecność tkanek wilczomleczy wpływa stymulująco na procesy zrostowe i rozwój kalusa u rącznika.

Nie zauważono wyraźnych różnic histologicznych w przypadku hodowli roślin *in vitro* i *in vivo*.

Jednak wyraźny efekt elongacyjny komórek miększu kory pierwotnej, perycyklu i rdzenia u rącznika należałoby prawdopodobnie przypisać działaniu IAA. Natomiast efekty organogenetyczne (rozwijanie się korzeni i pączków) prawdopodobnie były regulowane przez IAA, K i A.

Część doświadczalną pracy wykonano w Zakładzie Botaniki Farmaceutycznej AM w Łodzi.

Panu Doc. dr hab. F. Celińskiemu autorzy dziękują za przejrzanie maszynopisu.

(Wpłynęło dn. 15. VI. 1970 r.)

SUMMARY

Investigations were performed *in vitro* on the growth, organogenesis and anatomy of concrescence of segments taken from shoots of *Ricinus communis* L. and *Euphorbia lathyris* L.

The effect of indolylacetic acid (IAA), kinetin (K), and adenine (A) added to a fourfold concentration of White's mineral medium was tested. It was found that the action of IAA and K may be correlated by changing the concentration of A. It was demonstrated that the increment in callus mass depends more than does organogenesis on such factors as temperature, insolation and season. Neither the composition of the medium, nor the above named external factors exert a major influence on the concrescence of heterogenous segments. Both the species studied are characterised by a high immunological tolerance to the sap of the partner in the experiment. It would seem that the presence of the *Euphorbia* tissue has a stimulating influence on the process of coalescence and the development of callus in *Ricinus*.

No distinct histological differences were noted in the case of culture of the plants *in vitro* and *in vivo*. However, the marked effect of parenchyma cells elongation in the primary cortex, the pericycle and pith in *Ricinus* should probably be attributed to the action of IAA. The organogenetic effect (development of roots and buds) were probably controlled by IAA, K and A.

The experimental part of the study was performed in the Department of Pharmaceutical Botany, School of Medicine, Łódź.

The authors are indebted to dr hab. F. Celiński for critical reading of the manuscript.

* LITERATURA

- Boll W., 1956, Effect of sucrose concentration leught of passage minor element nutrition, and pH value an growth of excised tomato roots, Bot. Gaz. 116, 2: 156—162.
- Camus G., 1949, Recherches sur le rok des bourgeons dans les phenomènes de morphogenesis, Rev. Cytol. Biol. Veg. 11: 1—195.
- Filutowicz A., Kuźdowicz A., 1951, Mikrotechnika roślinna, PWR i L, Warszawa.
- Gajewski W., 1954, Zjawiska regeneracji u roślin. Zagadnienia regeneracji, Zeszyty problemowe „Nauki polskiej” PWN, 1: 24—41.
- Gautheret R. J., 1942, Manuel technique de culture de tissus vegetaux, Paris, Masson.
- Hecker E., 1968, Substancje czynne sprzyjające rozwojowi guzów z Euphorbiaceae, Dtsch. Spoth. Ztg. 108, 25: 372.
- Howell R., Skoog F., 1955, Effect of adenine and other substances on growth of excised *Pisum* epicotyls cultured *in vitro*, Amer. Bot. 42 (4): 356—360, wg Ref. Żurn. 1956, 3, 9778.
- Kuźdowicz A., 1954, Szczepienie wzajemne pomidora (*Lycopersicum esculentum*) i pieprzu tureckiego (*Capsicum annum*), Acta Agrobotanica 2(1): 97—102.
- Langeron M., 1949, Precis de Mikroskopie, Paris.
- Michniewicz M., 1956, Wpływ syntetycznych substancji wzrostowych na zranianie się szczepionych roślin zielnych różnej przynależności systematycznej Cz. I, Acta Agrobotanica 4: 87—120.

- Montant Ch. 1957, Essais de culture *in vitro* de fragments de tige d'*Euphorbia characias* L., Compt. rend Soc. biol, 151(2): 391—392.
- Olszewska M. J., Maciejewska-Potapczykowa W., Sempiańska E. 1957, Działanie kinetyny wyizolowanej z kwasu dezoksyrybonukleinowego (z grasicy) na tkanki roślinne. III Badania anatomiczne, Acta. Soc. Bot. Pol. 26(3): 533—596.
- Rennert A., 1965, Wzrost i hodowla *in vitro* tkanek z łodygi normalnej oraz tumora bakteryjnego *Nicotiana tabacum* L. i *Crotolaria spectabilis* L., Z. N. Un. Łódzkiego N. Mat. Przyn. Ser. II, 18: 135—145.
- Rodkiewicz B., 1952, Obserwacje nad zrastaniem się tkanek korzenia marchwi, hodowanych *in vitro*, Acta Soc. Bot. Pol. 21(4): 789—801.
- Rogozińska J., 1961, Organogeneza w tkance korzenia cykorii w zależności od obecności sacharozy i azotu w pożywce, Acta. Soc. Bot. Pol. 30, 1: 149—162.
- Rogozińska J. H., 1968, Wpływ substancji wzrostowych na organogenezę pędów igliczni, Acta Soc. Bot. Pol. 37(3): 484—491.
- Ruge U., 1955, Praktikum po Fizjologii Rosta i Razwitia Rastienii Izd. Inastr. Lit. Moskwa.
- Skoog F., Miller C. O., 1957, Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*, Sympos. Soc. Exptl. Biol. Vo 11 The biological action of growth substances: 118—131, cyt za Butenko 1964.
- Skoog F., Hamzi Q., Hamzi and Szweykowska A. M., and Nelson J. L., Kermit L., Carraway, Tozo Fujii, Helgeson J. P., and Loepphy R. N.; 1967, Cytokinins: Structure/activity relationships, Phytochemistry. 6(9): 1169—1192.
- Słabęcka-Szweykowska A., 1952, Warunki tworzenia się antocyjanu w tkance *Vitis vinifera* hodowanej *in vitro*, Acta Soc. Bot. Pol. 21(4): 537—576.
- Szweykowska A., 1961, Z zagadnień morfogenezy u roślin, Nowsze wyniki badań metodą hodowli *in vitro*, Wiad. Bot., 5(4): 271—280.
- Torrey J. G., 1958, Endogenous bud and root formation by isolated roots of *Convolvulus* grown *in vitro*, Plant. Physiol. 33(4): 258—263.
- Wetmore R. H., Serokin S., 1955, On the differentiation of ksylem, J. Arnold arboretum v. 36: 305—317.
- Wojciechowska B., 1971, O zdolnościach regeneracyjnych rącznika, Acta Agrobot. 24 (w druku).