

HISTOKEEMILISI ANDMEID ALPI KANNIKESE MUGULA REGENERATSIOONI- PROTSESSIDEST

A. Saar

EPA botaanika ja fütopatoloogia kateeder

Taimeorganite regeneratsiooni- ja reproduktsiooniprotsesside analüüsimisel ei saa piirduda ainult tsütoloogilis-histoloogiliste uurimistega, vaid oluline on seejuures käsitleda ka raku ja kudede keemiaga seoses olevaid küsimusi. Kaasaja tsütoloogilised ja histoloogilised uurimised peavad samaaegselt olema tsütokeemilised ja histokeemilised, sest taimeorganite vigastamisel toimub nende kudedes rida keemilisi muutusi, millega on võimalik seletada regeneratsiooniprotsessides ilmnevaid iseärasusi.

Käesoleva töö ülesandeks on püüda selgitada, missugused histokeemilised muutused tulevad esile alpi kannikese hüpokotüül- mugula kudede vigastamisel ja nende vigastatud kudede taastamisel. Selleks analüüsitakse mugula kudedes ja rakkudes füüsikaliskemiliste näitajate vastastikuseid seoseid ja mõnedes kõige iseloomulikumate orgaaniliste ainete olemasolu. Vaatluse alla on võetud kudede happelisus (pH), hapendus-taanduspotentsiaal (rH_2), oksüdaas, peroksüdaas, suhkrud, tärklis, lipiidid ja valgud.

Taimeorganeis regeneratsiooni- ja reproduktsiooniprotsesside ajal toimuvad biokeemilised muutused pole seni histokeemilistes uurimistes leidnud põhjalikku käsitlemist. Seepärast teostati rida katseid, et saada täiendavaid andmeid selles küsimuses.

Et käesoleva töö autor on juba varasemates töodes uurinud hüpokotüülis toimuvaid regeneratsiooni- ja reproduktsiooniprotsesse, siis langes valik histokeemiliste analüüside tegemisel sellele taimel, mille hüpokotüül on hästi arenenud. Niisuguseks taimeliks valiti alpi kannike (*Cyclamen persicum Mill.*), mille mugul kujutab endast hästi arenenud hüpokotüüli.

Et regeneratsiooni- ja reproduktsiooniprotsessid sõltuvad taime vanusest, arengufaasist ja regenereeruvast osast endast, siis teostati ka käsitletav histokeemiline uurimine selliselt, et saada iseloomulikke andmeid kõigis nendes kolmes aspektis, s. t. püüti selgitada

taime vanuse, arengufaaside ja regenereeruva mugula osa asukoha mõju histokeemilistele muutustele regeneratsiooniprotsessis.

Selleks uuriti erinevaid arengufaase histokeemiliselt terve aasta kestel. Uuritavate mugulate vanus kõikus kahest kuust kuni kolme aastani. Asukoha mõju selgitamiseks analüüsiti mugula apikaalse, mediaalse ja basaalse osa kudesid.

Alpi kannikese hüpokotüülmugulal regeneratsiooniprotsesside esilekutsumiseks lõigati osal mugulatel žiletiga pealt ära 3—4 mm, teistel mugulatel läbis lõige mediaalset või basaalset osa. Opereeritud hüpokotüülmugulad istutati kastidesse läbipestud või eelnevalt kuumutatud liiva nii, et lõikepind jäi liivast välja. Kastid kaeti pealt klaasiga, et selle all püsiks ühtlane õhuniiskus. Kastid pandi jahedasse valgesse ruumi (temperatuur 14°—16° C). Liiva niisutati iga 3—4 päeva järel. Üldse opereeriti 120 mugulat.

Käesolevas töös kasutati mugulakudede pH määramisel potentiomeetrilist meetodit. Redokspotentsiaali (rH_2) määramise põhimõtteks oli kasutatava elektroodi potentsiaali võrdlemine normaalse vesinikelektroodi potentsiaaliga (R a b o t n o v a, 1957).

Fermentidest määrati oksüdaas bensidiinilahusega ning peroksüdaas α -naftooli ja bensidiiniga (J o h a n s e n, 1940; P e a r s e, 1956). Suhkrute olemasolu tehti kindlaks Fehlingi ja Molischi reaktiiviga ning Flückigeri katse abil (Johansen, 1940). Tärglise määramisel kasutati J + KJ lahust.

Lipoidide määramisel mõjustati preparaate osmiumhappega. Paralleelselt kasutati veel sudaan IV (J o h a n s e n, 1940).

Valgud määrati Milloni, ksantoproteiin- ja biureetreaktsiooniga.

Seni väljatöötatud histokeemilisel meetodil on mitmeid puudusi. Ta võimaldab vaid kvalitatiivselt kindlaks teha, kas uuritavat ainet esineb rakus või mitte; nende hulka ei saa kvantitatiivselt määrata. Samuti pole võimalik mikroskoopiliselt küllaldase täpsusega määrata pH-d ja teisi kudede füüsikalisi-keemilisi näitajaid. Raskus seisneb selles, et kudede vigastamine kutsub rakus esile tugevaid biokolloidseid muutusi, mis peaaegu alati on seoses reaktsiooni muutustega.

Alpi kannikese hüpokotüülmugula kudede pH määramisel saadi kõige täpsemaid tulemusi potentiomeetrilisel meetodil, millest selgus, et alpi kannikese kahekuustel normaalsetel hüpokotüülmugulatel oli pH, 6,4—6,6, ühe kuni kolme aasta vanustel taimedel 7,0—7,9. Hüpokotüüli noortes mugulates mediaalses ja basaalses osas oli pH 6,9—7,0. Kahe ja kolme aasta vanustel mugulatel polnud kudede pH-s erinevusi.

Kahe kuu vanuste mugulate kudede apikaalse osa vigastuskoha lähedal oli pH 5,8—6,0, samade mugulate keskmise ja basaalse osa tervetes kudedes aga 6,3—6,4. Mediaalse ja basaalse osa vigastatud kudedes oli pH 6,0—6,1. Iseloomulik on, et pärast haava täielikku paranemist, s. t. peridermi teket, olid koed veel 3—4 kuud happelisema reaktsiooniga kui vigastamata koed. Alles pärast mu-

gulate täielikku regenereerumist ja reprodutseerumist kadus pH erinevus hüpokotüüli normaalsete ja regenereeruvate kudede vahel. Seda märgati mugula kõikides kasvufaasides ja hüpokotüüli kõikides osades. Vigastuskohalähedaste kudede reaktsiooni muutus on seletatav kudede üldiste füüsikalise-keemiliste muujustega. Vigastatud kudedes hingamine intensiivistub, mis toob kaasa sügavaid muutusi kudede reaktsioonis, redokspotentsiaalis, fermentide intensiivsuses jne. Kogu regenereeruva koe ainevahetus intensiivistub. Nagu histokeemilised uurimised näitasid, on nooremates mugulates, kus rakkudes toimuvad kasvuprotsessid intensiivsemalt, koed happelisema reaktsiooniga kui vanemates mugulates.

Ühe kuni kolme aasta vanuste mugulate kudede vigastamisel sõltus pH taime arengufaasidest. Taime opereerimine enne õitsemist andis mugula kudede pH-ks 6,5—6,8, õitsemisel 6,8—7,0 ja pärast õitsemist ja ka puhkeperioodis 7,6—7,7. Kudede aluseline reaktsioon viitab sellele, et puhkeperioodis on taime kasvuprotsessid pidurdunud ja rakkude paljunemine katkenud. Kudede vigastamine kutsub uuesti esile rakkude paljunemise, seega kasvu intensiivistumise. Rakkude paljunemisprotsessid toimuvad algul küll aeglaselt, kuid mõne aja pärast, kui opereeritud mugulad on soodsates tingimustes, paljunemine intensiivistub.

Kudede happelisus (pH) ja redokspotentsiaal (rH_2) on omavahel kindlas seoses, mida võib väljendada arvuliselt valemiga

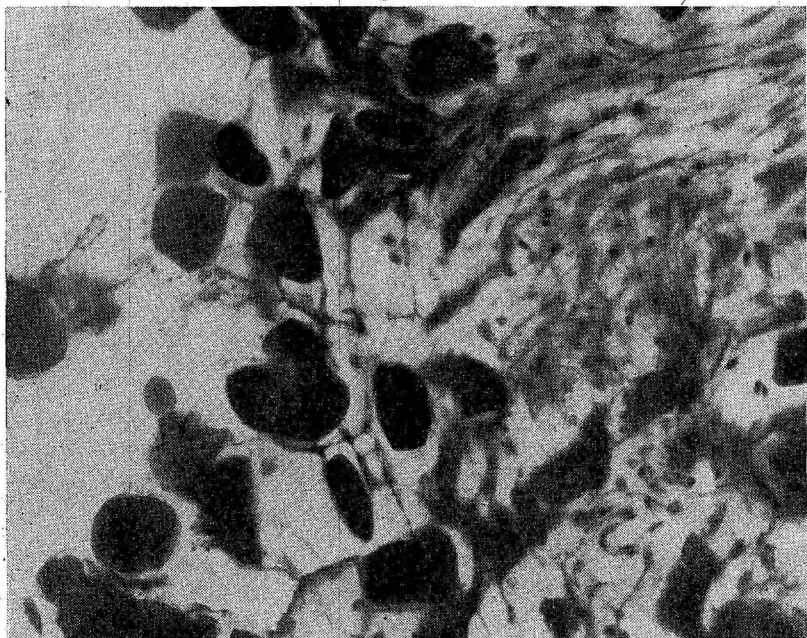
$$rH_2 = \frac{Eh \cdot 0,006 \text{ pH}}{0,03}, \text{ kusjuures } Eh \text{ väljendab pinget voltides, } rH_2$$

aga iseloomustab neid füüsikalise-keemilisi tingimusi, milledest sõltub fermentide töö. Nii on võimalik potentsiomeetrilisel meetodil mugulakudedes samaaegselt määrata pH-d ja Eh-d, millede kaudu saab välja arvutada rH_2 .

Kahekuustel kasvavatel mugulatel oli rH_2 väärtus 11—12. Ühe — kuni kolmeaastastel mugulatel oli kasvuperioodis rH_2 14—15, puhkeperioodis 16—18. Hüpokotüüli mediaalse ja basaalse osa parenhüümikudedes ei märgatud erinevusi. Erinevused olid mugula apikaalses osas, puhkepungades ja lehe algmetes. Siin oli rH_2 9—10. Redoksprotsessid on tihedas seoses taime kasvu ja vanusega. Kuu aega pärast mugula väljumist puhkeperioodist toimusid regeneratsiooniprotsessid kõige intensiivsemalt, sest sel ajal on kudedes happeline reaktsioon ja rH_2 kõige madalamad. Energilist kasvu ja rakkude paljunemist iseloomustab $Eh = (180—190)$.

Nii kahekuustes kui ka vanemates alpi kannikese hüpokotüülmugulates on rohkesti meristeemikudesid ja rakke, millel on piiramatut jagunemisvõimet. Sellest tingituna regenereerub alpi kannikese mugul ja annab uusi lehealgmeid, ükskõik missuguse vanusega või missuguses osas mugulat vigastada. Opereeritud hüpokotüülmugulatest arenevad uued taimed. Pärast operatsiooni kulgevad regeneratsiooniprotsessid intensiivselt, mida näitasid ka histoloogilised ja histokeemilised uurimised.

Histokeemilisel analüüsimisel selgus, et mugula vigastuskoha lähedased rakud värvusid 24 tundi pärast vigastamist hästi bensidiiniga. Reaktsioon ilmus 15—20 minuti jooksul. Raku happelise reaktsiooni korral oksüdaasi sisaldavad rakud muutusid tumesiniseks, aluselisel reaktsioonil aga pruunikaskollaseks. Siin kajastub tihe seos fermentide ja raku reaktsiooni vahel. Kümme päeva pärast mugula vigastamist paljunesid fastsikulaarse ja interfastsikulaarse kambiumi ja floemi rakud, moodustades kallusekühme. Lõikepinna lähedased parenhüümirakud, olles oksüdaasirikkad, muutusid tumesiniseks (joon. 1). Peale oksüdaaside esines veel peroksüdaasi.



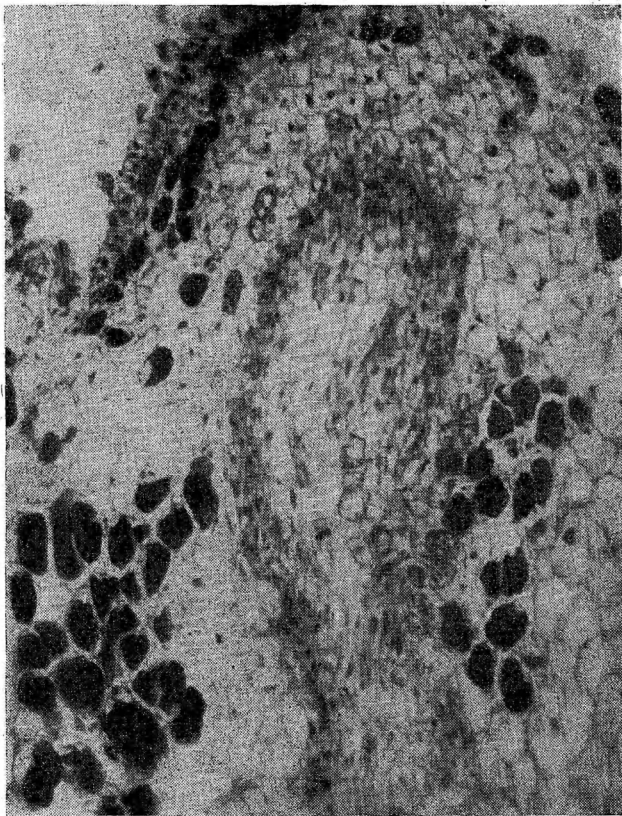
Joon. 1. Tumedaks muutunud fermentiderikkad rakud lõikepinna lähedastes kudedes.

Peroksüdaasi sisaldavad rakud muutusid bensidiini eriviisilisel (Johansen, 1940) kasutamisel rohekassiniseks. Alpi kannikese hüpokotüülmugula kõigis kasvufaasides, erinevas vanuses ja kogu hüpokotüüli ulatuses esinevad rakud, mis on oksüdaasi- ja peroksüdaasirikkad. Eriti meristeemikolde-lähedased rakud ja hüpokotüüli lõikepinna areneva adventiivpunga rakud (joon. 2).

Hapendus-taandusprotsessid saavad energiat süsivesikutelt. Kõikides opereeritud mugula regenereeruvates rakkudes ja kudedes võis kindlaks teha rohket suhkrute esinemist. Vigastamata mugula kudedes oli suhkruid vähem. Ainevahetusprotsesside intensiivistu-

misel regenereeruvates rakkudes suunatakse sinna suhkruid, mis on energiaallikaks. Samuti esines rohkesti suhkruid adventiiv- ja preventiivpungade kudedes. Tärgliseteri mugula kudedes ei olnud.

Tagavaraainetena pole suhkrutel puhkeperioodis nii suur tähtsus kui lipoididel. Seetõttu nähti preparaatides lipoide kõige rohkem puhkeperioodis olevate taimede (2 ja 3 aasta vanuste) mugulates. Eriti rohkesti oli lipoide preventiivpungades ja nende lähe-



Joon. 2. Fermentiderikkad rakud adventiivpungas (muskaks värvunud).

dastes kudedes. Kahe kuu vanuste mugulate kudedes lipoide ei täheldatud. Nii noortesse mugulatesse ei talletata varuaineid, sest kõik toitained kasutatakse ära intensiivsetes kasvuprotsessides.

Peale rasvade esinevad taimedel varuainena veel valgud. Tagavaraainena ladestuvad valgud aleuroonteradena rakkudesse. Kõige sagedamini täheldati erineva kujuga valgukristalle just mitme-

aastaste mugulate kudedes. Eriti rikkalikult oli neid hüpokotüüli-
kudedes puhkeperioodis.

Kokkuvõttes võib öelda, et vigastusega kaasnenud regenerat-
siooniprotsessid kutsusid alpi kannikese hüpokotüülmugulas esile
kudede reaktsiooni happelisemaks muutumise. Regeneereeruva koe
reaktsioon (pH) olenes taime arengufaasist, muutudes seda aluse-
lisemaks, mida aeglasemalt toimusid kasvuprotsessid.

Hapendus-taanduspotentsiaal on otseses seoses kudede happe-
lisusega ja hapendus-taandusfermentide intensiivsusega. Ta sõl-
tub arengufaasist ja taime vanusest.

Fermentid oksüdaas ja peroksüdaas esinesid alpi kannikese
hüpokotüülmugula vigastuskoha lähedastes rakkudes ja mugula
meristeemikollete lähedastes kudedes. Meristeemirakud paljunesid
intensiivselt.

Suhkrut oli kõikides rakkudes, eriti rikkalikult aga regeneereer-
vates rakkudes ja samuti preventiiv- ja adventiivpungades. Puhke-
perioodis esines suhkruid väga vähe üksikutel juhtudel. Puhke-
perioodis kogunes mugulatesse lipoide ja valke. Apikaalses osas
oli preventiivpungades rohkem lipoide kui teistes mugulakudedes.
Hüpokotüülmugula osa asukoht ei avaldanud eriti mõju füüsikalis-
keemilistele näitajatele ja biokeemilisele koostisele.

KIRJANDUS

Johansen, A. 1940. Plant Microtechnique. New York and London.

Пирс Э. 1956. Гистохимия. М.

Работнова И. Л. 1957. Роль физико-химических условий (рН и rH_2)
в жизнедеятельности микроорганизмов. М.

ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ ПРОЦЕССОВ РЕГЕНЕРАЦИИ В КЛУБНЯХ ЦИКЛАМЕНА

А. Саар

Резюме

Процессы регенерации, сопровождающие повреждение гипо-
котильного клубня цикламена, вызывают в нем усиление кис-
лой реакции. Реакция регенерирующей ткани (рН), находясь
в зависимости от фазы развития растения, становилась тем бо-
лее щелочной, чем медленнее протекали процессы роста.

Окислительно-восстановительный потенциал находится
в прямой зависимости от кислотности тканей и от интенсив-
ности ферментов.

Ферменты оксидаза и пероксидаза содержатся в клетках гипокотильных клубней цикламена, расположенных поблизости от места повреждения, и в тканях, находящихся вблизи меристематических очагов. Сахар содержится во всех клетках, его особенно много в клетках, подверженных регенерации, а также в превентивных и адвентивных почках. В период покоя клубни содержат липоиды и белки.

Местонахождение части гипокотильного клубня не оказывало особого влияния на физико-химические показатели и на содержание органических веществ.

EINIGE HISTO-CHEMISCHE DATEN ZU DEN REGENERATIONSERSCHEINUNGEN IN DER KNOLLE DES ALPENVEILCHENS

A. Saar

Zusammenfassung

Die auf die Verletzung folgenden Regenerationsprozesse bewirkten in den Geweben der Hypokotylknolle des Alpenveilchens ein Saurerwerden der Reaktion. Die Reaktion des regenerierenden Gewebes (pH) war von der Wachstumsphase der Pflanze abhängig, und zwar wurde mit der Verlangsamung des Wachstumsprozesses die Reaktion in steigendem Maße basisch.

Von Fermenten fanden sich Oxydase und Feroxydase in den nahe der Verletzungsstelle der Knolle befindlichen Zellen wie auch in den meristematischen Herden der Knolle umgebenden Geweben. Zucker enthielten alle Zellen, wobei die regenerierenden Zellen sowie die Präventiv- und Adventivknospen den höchsten Zuckergehalt aufwiesen. Während der Vegetationsruhe sammelten sich in den Zellen Lipoide und Eiweiße an.

Für die chemisch-physikalischen Werte wie auch für den Gehalt an organischen Stoffen war es belanglos, mit welchem Teil der Hypokotylknolle der Versuch ausgeführt worden war.