

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XVI, 40

SECTIO D

1961

Z Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej
w Lublinie

Kierownik: prof. dr med. Stanisław Grzycki

Jadwiga MIŁKOWSKA

**Histochemiczne badania grup sulfhydrylowych w merystematycznych
komórkach roślinnych**

**Гистохимические исследования сульфгидрильных групп
в меристематических растительных клетках**

**Histochemical Investigations of Sulphhydryl Groups in Meristematic
Plant Cells**

Istnieją dwa główne źródła grup sulfhydrylowych w komórkach i tkankach: glutation (G. SH.) biorący udział w procesach oksydoredukcyjnych i grupy SH związane z białkami, które mogą występować jako wolne albo jako zamaskowane. Joyet-Lavergne (1928) do określenia umiejscowienia glutationu użył metody tzw. nitroprusydkowej, przy której pomocy grupy SH barwią się na kolor czerwonopurpurowy nitroprusydkiem sodu w obecności jonów hydroksylowych i nasyconego roztworu siarczanu amonu. Giroud i Bulliard (1929) oraz Giroud (1931) natomiast posługiwali się reakcją nitroprusydkową dla poznania umiejscowienia grup sulfhydrylowych cysteiny. Okazało się jednak, że reakcji nitroprusydkowej nie można przeprowadzać na komórkach i tkankach utrwalonych, a uzyskane wyniki na tkankach świeżych nie pozwalają nie tylko na dokładną ocenę ilości grup SH, ale także na dokładne określenie umiejscowienia tych grup.

Bennett (1951) i inni badacze, posługując się odczynnikiem RSR (Red Sulphhydryl Reagent), uznanym za całkowicie swoisty dla grup SH, mogli wybarwiać te grupy w tkankach utrwalanych albo w 5% kwasie trójchlorooctowym i odwadnianych w alkoholu, albo w 80% lub 100% etanolu, albo wreszcie w formalinie i zamkniętych w parafinie. Również swoistym odczynnikiem dla grup SH w komórkach i tkankach,

pozwalającym na badanie tkanek utrwalonych jest barwienie skrawków mikrotomowych przy pomocy czerni K wg sposobu podanego przez Barnetta i Seligmana (1952). Metodę tę zastosowaliśmy do przeanalizowania rozmieszczenia badanych grup w komórkach roślinnych, tym bardziej że wszystkie metody opracowane dla wykrywania grup sulfhydrylowych dotyczą tkanek i komórek zwierzęcych. Próby zastosowania tych metod, a szczególnie metody Barnetta i Seligmana dały wyniki zachęcające do prowadzenia dalszych obserwacji.

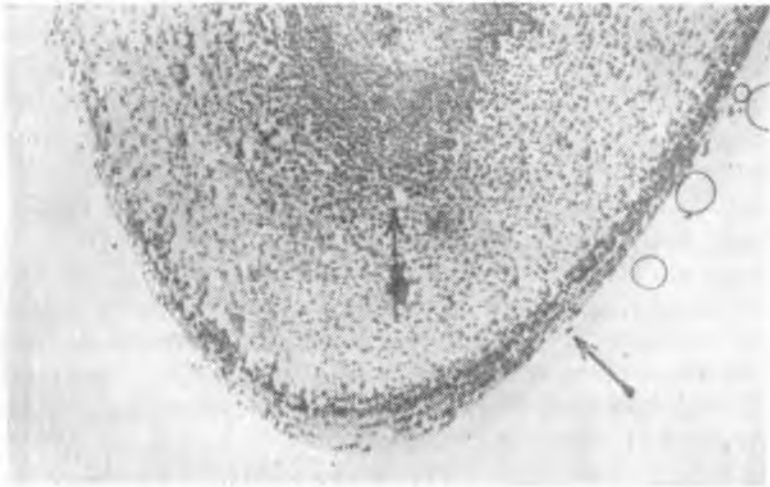
MATERIAŁ I METODA

Badania histochemiczne przeprowadzono na merystematycznych komórkach 3-dniowych korzonków kiełkujących nasion bobu (*Vicia faba* L.) i kukurydzy (*Zea mays* L.) Materiał utrwalano przez 24 godziny w 1% roztworze kwasu trójchlorooctowego w 80% alkoholu i po odwodnieniu zamykano w parafinie. Skrawki mikrotomowe, grubości 5–8 mikronów, po odparafinowaniu inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 50°C w 0,1 M buforze barbiturowym Michaelisa z dodanym alkoholem bezwodnym zawierającym odczynnik DDD (dwuhydroksy-, 6,6- dwunaftyłodwusiarczek) i barwiono czernią K rozpuszczoną w 0,1 M buforze fosforanowym Sörensena. W wyniku przeprowadzonego postępowania wg metody Barnetta i Seligmana otrzymano szarofioletowe lub brunatnofioletowe zabarwienie grup SH w obserwowanych komórkach. Chcąc jednak przekonać się czy otrzymany wynik jest specyficzny należało naprzód zablokować grupy SH, działając na skrawki mikrotomowe po odparafinowaniu roztworem kwasu monojodooctowego w 1 N NaOH i wodzie destylowanej albo 1–2% roztworem sublimatu, a następnie przeprowadzając odczyn Barnetta i Seligmana. Wszystkie preparaty po zabarwieniu zamykano w glicerożelu, trwałość zabarwienia jest zachowana przez długi czas.

BADANIA WŁASNE

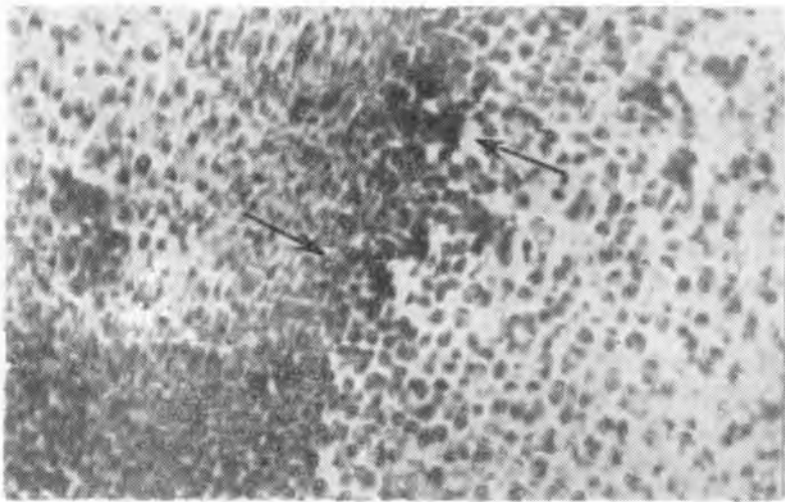
Obserwacjom histochemicznym poddano merystematyczne komórki tworzące strefy inicjalną i wzrostu trzydniowego korzenia kiełkujących nasion bobu (*Vicia faba* L.) i kukurydzy (*Zea mays* L.). Komórki poddzielane były od siebie cienkimi błonkami a w protoplazmie ich widoczne były drobne wakuole grupujące się albo w okolicy jądra, albo na obwodzie. Komórki czapeczki, inicjalne, pleromu, peryblemu i dermatogenu obserwowane na przekrojach podłużnych i poprzecznych korzenia można było łatwo zróżnicować i warstwy histogenów były wyraźnie dostrzegalne. Zwróciliśmy jednak uwagę, że pomiędzy pleromem a peryblemem znajdują się zawsze jeden, dwa lub kilka rzędów komórek, które na kształt pochewki otaczają walec pleromu. Komórki te prawdopodobnie tworzą tzw. perykambium, o którym w pracy swojej wspomina Guttenberg (1960).

Przeprowadzony odczyn Barnetta i Seligmana, specyficzny dla grup SH, pozwolił przeanalizować umiejscowienie tych wiązań za-



Ryc. 1. Dodatni odczyn Barnetta i Seligmána w histogenach korzenia bobu (*Vicia faba* L.) Mikroskop Lumipan C. Zeiss (Jena). Mikrofot. Exacta Varex II a.
Positive reaction by the method of Barnett and Seligman in the histogenes of the root of *Vicia faba* L. Microscope Lumipan C. Zeiss (Jena). Microphot. Exacta Varex II a.

Положительная реакция по Барнетту и Зелигману в гистогенах корня конских бобов (*Vicia faba* L.). Микроскоп Lumipan C. Zeiss (Jena). Микрофот. Exacta Varex IIa.



Ryc. 2. Merystematyczne komórki perykambialne i dermatogenu korzenia bobu (*Vicia faba* L.). Dodatni odczyn Barnetta i Seligmána. Mikroskop Lumipan C. Zeiss (Jena). Mikrofot. Exacta Varex II a.

Meristematic pericambium and dermatogen cells of *Vicia faba* L. Positive reaction by the method of Barnett and Seligman. Microscope Lumipan C. Zeiss (Jena). Microphot. Exacta Varex II a.

Меристематические перикамбиальные клетки и дерматоген конских бобов (*Vicia faba* L.). Положительная реакция по Барнетту и Зелигману. Микроскоп Lumipan C. Zeiss (Jena). Микрофот. Exacta Varex IIa.

równy w histogenach jak i w samych komórkach merystematycznych korzeni bobu i kukurydzy. Dodatni odczyn wyrażał się albo dyfuzyjnym zabarwieniem protoplazmy na kolor szarofioletowy lub brunatnofioletowy, albo nagromadzeniem się w niej bardzo drobnych brunatnych lub brunatnofioletowych ziarenek wypełniających ją niemal całkowicie. W cytoplazmie najsilniejszy odczyn obserwowano przy błonie jądrowej i błonie komórkowej. W jądrach komórkowych odczyn na SH był równomierny ale słabszy niż w cytoplazmie. Czasami SH grupowały się w okolicy jąderka, co mogło przypominać rozmieszczenie kwasów nukleinowych w chromatynie przyjąderkowej. Nagromadzenie dodatnich ziarenek w komórce było niejednokrotnie tak wielkie, że maskowało jądro i jąderko komórki, która wówczas w całości miała wygląd ciemnofioletowy (ryc. 1 i 2).

Dodatni odczyn Barnetta i Seligmana dla grup SH był bardzo wyraźny w komórkach czapeczki, inicjalnych, dermatogenu i komórkach perykambialnych. W komórkach pleromu i peryblemu natomiast odczyn był bardzo słaby, raczej był on ujemny (ryc. 1 i 2).

Uzyskane wyniki sprawdzono blokując grupy SH przy pomocy kwasu moncjodooctowego, który znosił całkowicie barwną reakcję. W ten sposób można było upewnić się także, że odczyn Barnetta i Seligmana może być przydatny do badań histochemicznych komórek roślinnych i że grupy SH w merystematycznych komórkach korzenia mają swoje umiejscowienia oraz jak sądzi Łatałski (1961) mogą świadczyć o wysokim poziomie tioli białkowych cytoplazmy.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Bell (1958) zwrócił uwagę, że udział RNA w syntezie białek jest uwarunkowany obecnością grup SH. Grupy SH stanowią także ważny składnik w budowie enzymów, z których wiele wykazuje czynność katalityczną tylko wówczas, gdy ich grupy SH są wolne. Również liczni badacze, omawiając procesy oksydoredukcyjne związane z oddychaniem komórki, duże znaczenie przypisują wiązaniom SH. Z procesami oksydoredukcyjnymi są najprawdopodobniej związane różne procesy syntezy i przemian.

Wyraźny odczyn histochemiczny Barnetta i Seligmana w merystematycznych komórkach czapeczki, inicjalnych i dermatogenu a przede wszystkim w komórkach perykambialnych może więc wskazywać, że odznaczają się one wzmożoną przemianą materii, a tym samym mogą odgrywać ważną rolę w procesie tworzenia się tkanek stałych korzenia.

PIŚMIENNICTWO

1. Barnett R. J., Seligman N. M.: Science, **116**, 323—327, 1952.
2. Bell L. G. E.: Sulphhydryl Groups and Ribonucleic Acid. Nature, **182**, 1088—1089, 1958.
3. Bennett H. S.: The Demonstration of Thiol Groups in Certain Tissues by Means of a New Colored Sulphhydryl Reagent. Anat. Rec. **110**, 231—248, 1951.
4. Giroud A.: Les substances à fonction sulfhydryle du protoplasma. Protopl. **12**, 23—41, 1931.
5. Giroud A., Bulliard H.: Substances à fonction sulfhydrile de l'épiderme. Bull. Assoc. Anat. **18**, 248—250, 1929.
6. Guttenberg H.: Grundzüge der Histogenese höherer Pflanzen. I. Die Angiospermen. Ed. Borntraeger. Berlin-Nikolassee. 1960, 1. Kapit. Die Entwicklung der Wurzel.
7. Joyet-Lavergne Ph.: La recherche qualitative de glutathion. Bull. d'histol. appl. **5**, 331, 1928.
8. Latański M.: Badania nad kwasem rybonukleinowym i grupami sulfhydrylowymi w komórce jajowej. Ann. Mariae Curie-Skłodowska, Sec. D. **16**, 27—42, 1961.

РЕЗЮМЕ

Гистохимические исследования SH-групп в меристематических клетках корня *Vicia faba* и *Zea mays* проводились с помощью метода Барнетта и Зелигмана. Оказалось, что отчетливая положительная реакция наблюдается в клетках корневого чехлика, инициальных клетках и в клетках дерматогена. Особенно ярко эта реакция проявляется в клетках перикамбия. Полученные данные видимо свидетельствуют о том, что эти клетки играют важную роль в процессе образования постоянных тканей корня.

SUMMARY

Histochemical investigations of sulphhydryl groups in meristematic cells of *Vicia faba* L. and *Zea mays* L. were carried out by the method of Barnett and Seligman. The investigations show that a positive reaction occurs in the root cap, dermatogen and apical cells and especially in the pericambium cells. The results obtained show that these cells take an important part in the formation of the permanent tissues of the root.

