

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XVII, 24

SECTIO D

1962

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii. Wydział Lekarski.
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr med. Stanisław Grzycki

Kazimiera GRZYCKA

**Badania refraktometryczne mitochondriów merystematycznej komórki
roślinnej w mikroskopie fazowo-kontrastowym**

**Рефрактометрические исследования митохондрий меристематической
растительной клетки в фазово-контрастном микроскопе**

**The Refractometry of the Mitochondria of Meristematic Plant Cells
in Phase Contrast Microscopy**

Używane w cytologii metody utrwalania i barwienia mitochondriów w komórkach roślinnych i zwierzęcych, jak np. Altmanna, Bendy, Mevesa, Regaud, Alvarado, Zenkera, Helly, Champy i innych pozwalają na dokonywanie obserwacji nad ilością, umiejscowieniem, wielkością i udziałem tych elementów w przejawach życiowych komórek. Mikroskop elektronowy umożliwia poznanie ultrastruktury mitochondriów, natomiast mikroskop fazowo kontrastowy daje obrazy mitochondriów nie tylko w komórkach żywych, ale także w komórkach utrwalonych i nie barwionych. Wprowadzona również do badań cytologicznych i histologicznych przez Hancoxa i Kruszyńskiego (1956) oraz Grzyckiego (1958—1961) technika refraktometryczna przy użyciu oświetlenia fazowo kontrastowego, rozszerzyła zakres możliwości badań elementów komórkowych i poznanie ich własności fizycznych.

Perner i Pfefferkorn (1953), Newcomer (1940, 1951), Hackett (1955), Bautz (1956) i Dangeard (1958) zajmowali się głównie morfologią i umiejscowieniem mitochondriów w komórkach roślinnych, przy czym posługiwali się oni w badaniach przeważnie metodami klasycznymi utrwalania i barwienia. Obserwacje mitochondriów komórek roślinnych pozostających w warunkach doświadczalnie zmienionych przeprowadzali Radu (1943/44) i Dufrénoy (1947),

a Steffen (1953), Fröhlich (1953) i inni wykazali możliwość zastosowania mikroskopu fazowo kontrastowego do badań elementów w komórkach roślinnych żywych, nie utrwalonych i nie barwionych przyżyciowo. W roku 1961 Grzycki zastosował technikę refraktometryczną do badań mitochondriów w komórkach zwierzęcych i wykazał ich współczynnik refraktometryczny (RI), który równał się 1.5589 w komórkach nerki żaby, a 1.5462 w komórkach trzustki szczura białego.

MATERIAŁ I METODA BADAŃ

Komórki merystematyczne 3-dniowego korzenia kukurydzy (*Zea mays* L) po utrwaleniu w mieszaninie alkoholu absolutnego z kwasem octowym lodowatym w stosunku 1:3, a następnie po odwodnieniu i zamknięciu w parafinie, obserwowano na cienkich ($5\ \mu$) skrawkach mikrotomowych. Skrawki mikrotomowe umieszczone na szkiełkach przedmiotowych po odparafinowaniu w p-xylenie i dokładnym osuszeniu, nie barwione, poddano obserwacji w mikroskopie fazowo kontrastowym Lumipan C. Zeiss (Jena), używając obiektywu immersyjnego Ph HI 90/1,25 i okularu PK 12,5 x (Homal II). Mikrofotografie wykonano aparatem Practina FX na błonach Agfa Isopan FF, super-ortopanchromatycznych przez filtr żółtozielony VG 4 (2). W technice refraktometrycznej posługiwano się następującymi płynami o znanym współczynniku refraktometrycznym (RI): 1-bromonaftalen (1.6575), chinolina (1.6161), o-toluidyna (1.5678), N,N-dwumetyloanilina (1.5566), nitrobenzen (1.5518), acetofenon (1.5530), toluen (1.4955) i czterochlorek węgla (1.4601).

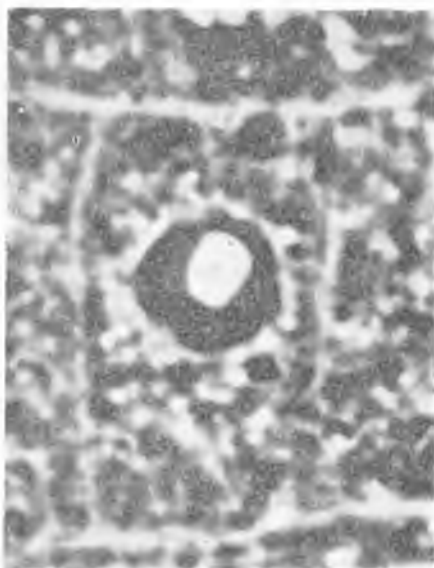
OBSERWACJE I OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Mitochondria w komórkach roślinnych utrwalonych i barwionych hematoksyliną Heidenhaina wg metody Regaud mają wygląd bardzo drobnych ziarenek (np. w korzonku *Pinus pinaster*), pałeczek (np. w korzonkach *Scorsonera*, *Allium cepa*, *Vicia faba*), albo krótkich lub długich nitek (np. w korzonkach *Clathrus cancellatus*, *Draparnaldia glomerata*). W warunkach doświadczalnych natomiast, względnie po użyciu nieodpowiednich płynów utrwalających mitochondria ulegają zwykle zmianom kształtu, wielkości i barwliwości, a nawet wakuolizacji. Np. kwas octowy w rozcieńczeniu wodnym 1:1000 powoduje nieodwracalny wyraźny przerost i wakuolizację mitochondriów, a chloroform, eter i inne czynniki chemiczne i fizyczne (podwyższona temperatura) prowadzą do rozpadu mitochondriów pałeczkowatych i nitkowatych na drobne ziarenka. Wiadome jest również, że kształt, ilość i umiejscowienie mitochondriów, które biorą bezpośredni udział w przemianie materii komórki mogą ulegać zmianom w zależności od jej stanu czynnościowego. Formy ziarniste mogą łączyć się w liniowe zespoły tworząc pałeczki względnie niteczki, które ponownie mogą rozpadać się

na ziarenka. Tego rodzaju przemiany pozostają w granicach fizjologicznych i są dowodem czynnego udziału mitochondriów w życiu komórki.

W komórkach merystematycznych korzonka kukurydzy (*Zea mays* L) mitochondria zgrupowane były przeważnie w strefie dokołajądrowej, w mniejszej ilości rozsypane po cytoplazmie obwodowej. W 1-bromonaftalenie (RI = 1.6575) miały one wygląd jasnych, fazowo ujemnych, błyszczących ziarenek pojedynczych, albo tworzących różańcowate krótkie pałeczki (ryc. 1), podczas gdy w czterochlorku węgla (RI = 1.4601), a więc w płynie o niskim współczynniku refraktometrycznym, były one czarne, fazowo dodatnie, wyraźnie odróżniające się od fazowo ujemnego podłoża cytoplazmy podstawowej (ryc. 3). W płynach pośrednich pomiędzy RI = 1.6575 a RI = 1.4601, jak np. w chinolinie (1.6161), o-toluidynie (1.5678), N,N-dwumetyloanilinie (1.5566), acetofenonie (1.5330) i toluenie (1.4955) obrazy mitochondriów stawały się mniej wyraźne, co wskazywało na zanik faz dodatnich względnie ujemnych w zależności od wartości ich RI.

Zastosowanie do badań refraktometrycznych nitrobenzenu (RI = 1.5518) powodowało całkowity zanik obrazu mitochondriów, mimo



Ryc. 1. Komórka merystematyczna 3-dniowego korzonka *Zea mays* L. Jasne ziarniste mitochondria przeważnie w strefie dokołajądrowej. Utrwal. alk. absol. + kwas octowy lodowaty 1 : 3. Nie barwiony. 1-bromonaftalen (RI = 1.6575).

Meristematic cell of a 3-day old root of *Zea mays* L. Light, granular mitochondria mainly in the perinuclear zone. Alcohol + acid. glac. (1 : 3). Unstained. 1-bromonaphthalene (RI = 1.6575)

że błona komórkowa, jąderko i inne elementy cytoplazmy miały jeszcze bardzo słabą fazę ujemną (ryc. 2). Zanik obrazu mitochondriów w nitrobenzenie czyli otrzymanie fazy zerowej dla mitochondriów wskazywało, że ich współczynnik RI równa się współczynnikowi nitrobenzenu i wynosi 1.5518. Uzyskany przez nas wynik jest bardzo zbliżony do wyników otrzymanych przez Grzyckiego dla mitochondriów komórki kanałika nerki żaby (RI = 1.5589), a zatem dla komórek posiadających wzmoczoną przemianę materii.



Ryc. 2. Komórka merystematyczna 3-dniowego korzonka *Zea mays* L. Utrwal. jak na ryc. 1. Nie barwiony. Nitrobenzen (RI = 1.5518). Mitochondria niewidoczne, faza obojętna
Meristematic cell of a 3-day old root of *Zea mays* L. Fixation as in Fig. 1. Unstained. Nitrobenzene (RI = 1.5518). Mitochondria invisible, neutral phase



Ryc. 3. Komórka merystematyczna 3-dniowego korzonka *Zea mays* L. Utrwal. jak na ryc. 1. Nie barwiony. Czterochlorek węgla (RI = 1.4601). Mitochondria mają wygląd czarnych, fazowo dodatnich ziarenek zgrupowanych dokoła jądra
Meristematic cell of a 3-day old root of *Zea mays* L. Fixation as in Fig. 1. Unstained. Carbon tetrachloride. (RI = 1.4601). Mitochondria have appearance of black, phase positive granules aggregated around the nucleus.

W poprzednich naszych badaniach (Grzycka, 1962) dotyczących również komórek merystematycznych korzonków roślin wykazaliśmy, że współczynnik RI błony komórkowej wynosi 1.5002, a jąderka 1.5430. Istnieją zatem różnice własności fizycznych pomiędzy różnymi elemen-

tami komórki, które najprawdopodobniej spowodowane są różną strukturą i różnym składem chemicznym. Potwierdzenia tych przypuszczeń należałoby oczekiwać po przeprowadzeniu badań cytochemicznych względnie po dokonaniu obserwacji w mikroskopie elektronowym.

Na podstawie naszych badań refraktometrycznych nie można było również ustalić zależności pomiędzy własnościami fizycznymi, kształtem, ilością i umiejscowieniem a czynnością fizjologiczną mitochondriów w merystematycznej komórce roślinnej. Wydaje się nam jednak, że umiejscowienie mitochondriów przeważnie w strefie dokoła-jądrowej może wskazywać na istnienie współpracy mitochondriów z jądrem i cytoplazmą.

PIŚMIENNICTWO

1. Bautz E.: Die Mitochondrien und Sphärosomen der Pflanzenzelle. Z. Bot. **44**, 109—136, 1956.
 2. Dangeard P.: Le chondriome de la cellule végétale: morphologie du chondriome. *Protoplasmatologia* III, 1—35, 1958.
 3. Dufrenoy J.: Conséquences cytochimiques du chauffage des tissus à des températures comprises entre 50 et 56° C. *Rev. Canad. Biol.* **6**, 211—228, 1947.
 4. Fröhlich K. O.: Phasenkontrastmikroskopie. *Deutsch. Gesundheitswes.* **8**, 953—957, 1953.
 5. Grzycka K.: Research into the Cell Membrane of Plants by Phase Contrast Refractometry. *Acta anat.* **51**, 153—161, 1962.
 6. Grzycka K.: Refraktometria jąderka merystematycznych komórek roślinnych w oświetleniu fazowo kontrastowym. *Ann. Univ. Mariae Curie Skłodowska, Lublin, Sec. D*, **17**, 333—342, 1962.
 7. Grzycki S.: Examination of Mitochondria by Phase Contrast Refractometry. *Acta anat.* **45**, 124—132, 1961.
 8. Hackett D. P.: Recent Studies on Plant Mitochondria. *Intern. Rev. Cytol.* **4**, 143—196, 1955.
 9. Hancox N. M., Kruszyński J.: Refractometry of Tissue Sections by Phase Contrast Microscopy. *Exper. Cell. Research.* **13**, 189—193, 1957.
 10. Newcomer E. H.: Mitochondria in Plants I. *The Bot. Rev.* **6**, 85—147, 1940.
 11. Newcomer E. H.: Mitochondria in Plants II. *The Bot. Rev.* **17**, 53—89, 1951.
 12. Perner E. S., Pfefferkorn G.: Pflanzliche Chondriosomen im Licht- und Elektronenmikroskop. *Flora* **140**, 98—129, 1953.
 13. Radu V. V.: Germination des graines de *Zea Mays* à diverses températures. Comportement du chondriome et des nucléoles dans la radicule. *Acad. roum. Bull. Sec. Sci.* **26**, 393—407, 1943/44.
 14. Steffen K.: Cytologische Untersuchungen an Pollenkern und- schlauch. 1. Phasenkontrastoptische Lebenduntersuchung an Pollenschläuchen von *Gallanthus nivalis*. *Flora* **140**, 140—174, 1953.
-

РЕЗЮМЕ

В меристематических клетках трехдневного корня *Zea mays* L., фиксированных и неокрашенных, митохондрии были подвергнуты рефрактометрическим исследованиям при фазово-контрастном освещении. Митохондрии были скоплены преимущественно в зоне около ядра и имели вид либо отдельных зерен либо образовывали короткие палочки. После употребления нитробензола оказалось, что коэффициент RI митохондрий составлял 1.5518. Скопление митохондрий в околоядерной зоне может указывать на существование функциональной связи между митохондриями с одной стороны а ядрами и цитоплазмой с другой.

SUMMARY

In fixed and unstained meristematic cells of a 3-day old root of *Zea mays* L. mitochondria were refractometrically examined by phase contrast illumination. The mitochondria were aggregated mainly in the perinuclear zone and had appearance of single granules or formed short, rosary-like rods. On using nitrobenzene the RI of the mitochondria was found to be 1.5518. The distribution of the mitochondria in the perinuclear zone suggests that there is a relationship between the mitochondria, on the one hand, and the nucleus and the cytoplasm, on the other.