

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE - SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XIX, 53

SECTIO D

1964

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

1

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej. Wydział Farmaceutyczny.
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr Tadeusz Szywał

Jadwiga MIŁKOWSKA

**Histochemiczne i histofotometryczne badania białkowych grup SH
i SS w merystematycznych komórkach korzeni**

**Гистохимические и гистофотометрические исследования
белковых групп SH и SS в меристематических клетках корней**

**Histochemical and Histophotometric Investigations of Protein-Bound SH
and SS Groups in the Meristematic Root Cells**

Zastosowanie metody Barnetta i Seligmana, która, jak podają Carfuny, Di Stefano i Farah (1954) oraz Findlay (1954), jest specyficzną dla ujawnienia grup sulfhydrylowych, związanych z białkiem, pozwoliła Miłkowskiej (1961, 1962) przeanalizować merystematyczne komórki korzeni *Vicia faba* L., *Zea mays* L. i *Allium cepa*. Odczyn barwny na białkowe grupy SH przy użyciu tej metody ograniczał się głównie do komórek dermatogenu, centrum nieczynnego i komórek czapeczki. Zajmowano się więc dotychczas przede wszystkim przydatnością metody Benetta oraz Barnetta i Seligmana do histochemicznego wykrywania białkowych grup SH i SS oraz umiejscowienia tych grup w komórkach roślinnych przed i po podziale mitotycznym, a także w komórkach merystematycznych. Carfuny, Di Stefano i Farah podali również sposoby cytofotometrycznego oznaczania ilościowego białkowych grup SH i SS w komórkach zwierzęcych.

W pracy naszej postanowiono przebadać histochemicznie i histofotometrycznie białkowe grupy SH i SS w merystematycznych komórkach korzeni słonecznika (*Helianthus annuus* L.) kielkujących pod wpływem czynników chemicznych (powszechnie stosowane nawozy sztuczne, jak np. sól potasowa (KCl) i superfosfat Ca (H₂PO₄)₂).

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Badaniom histochemicznym poddano korzenie zarodkowe, 1-dniowe i 3-dniowe słonecznika (*Helianthus annuus* L.) wykiełkowane w roztworach soli potasowej (KCl) i superfosfatu o stężeniach: 1 %, 0,5 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,01 %, 0,005 % i 0,001 %. Doświadczenie podzielono na 2 grupy — **A** i **B**.

1. W grupie doświadczeń **A** oznaczono oddzielnie SH i SS w korzeniach słonecznika (*Helianthus annuus* L.) kiełkujących w roztworach soli potasowej.

2. W grupie doświadczeń **B** przebadano zawartość grup SH i SS w korzeniach słonecznika (*Helianthus annuus* L.) kiełkujących w roztworach superfosfatu.

Pobrany do badań histochemicznych materiał z grup doświadczalnych **A** i **B** utrwalono i barwiono wg metody Barnetta i Seligmana (1952, 1954). Korzonki utrwalano w 80% alkoholu etylowym z kwasem trójchlorooctowym a następnie odwadniano w alkoholu etylowym, prześwietlano w benzenie i zamykano w parafinie. Skrawki mikrotomowe grubości 5μ nanoszono na szkiełka przedmiotowe. Dla uzyskania barwnych odczynów histochemicznych przy wykrywaniu grup SH używano roztworu DDD (dwohydroksy-6, 6-dwunaftylodwusiarczki) i czerni K (Fast Black K Salt) (1 preparat — P_1). Drugi preparat stanowił kontrolę reakcji a jednocześnie służył do obliczania ekstynkcji. Kontrola polegała na użyciu czerni K bez inkubacji w DDD (2 preparat — P_2). Trzeci preparat, nie barwiony zamykano w glicerozelu. Przy wykrywaniu grup SS blokowano grupy SH roztworem kwasu monojodooctowego, a grupy SS redukowano kwasem tioglikolowym. Poza tym preparaty inkubowano w DDD i barwiono czernią K (4 preparat — P_4). Kontrola reakcji polegała na tym, że po zablokowaniu kwasem monojodooctowym i inkubacji w DDD barwiono preparaty czernią K (5 preparat — P_5). Zawartość grup SH i SS jednocześnie określano w preparatach inkubowanych w kwasie tioglikolowym, następnie w roztworze DDD i barwionych czernią K (6 preparat — P_6). Posługując się fotometrem C. Zeissa (Jena), obliczano ekstynkcję grup SH wg wzoru Sandrittera (1961) w modyfikacji Kudejko (1963) dla 4 histogenów korzenia, a mianowicie: kalyptrógenu, dermatógenu, peryblemu i pleromu. W każdej warstwie badano po 50 punktów w 4 kolejnych skrawkach, następnie oznaczano średnią wartość dla poszczególnych warstw. Drugi pomiar dotyczył obliczenia średniej wartości dla preparatów kontrolnych (bez inkubacji w DDD), natomiast trzecim pomiarem było oznaczenie średniej wartości dla preparatów nie barwionych. Mając średnią wartość dla preparatów nie barwionych tzw. tło preparatu (T), dla preparatów barwionych na grupy SH (P_1) oraz dla preparatów kontrolnych (P_2) określano ekstynkcję grup SH (E_{SH}) wg wzoru:

$$E_{SH} = \frac{T}{P_1} - \frac{T}{P_2}$$

Ekstynkcję grup SS obliczano podobnym wzorem:

$$E_{SS} = \frac{T}{P_4} - \frac{T}{P_5}$$

(P_4 = średnia arytmetyczna przepuszczalności światła preparatów barwionych na obecność grup SS; P_5 = średnia przepuszczalność światła preparatów kontrolnych dla SS).

Potwierdzeniem otrzymanych wyników było obliczenie ekstynkcji dla grup SS i SH jednocześnie wg wzoru:

$$E_{SH + SS} = \frac{T}{P_6} - \frac{T}{P_2}$$

(P_6 = średnia przepuszczalności światła preparatu barwionego wspólnie na grupy SH i SS). Uzyskane wyniki badań i ekstynkcji przeanalizowano statystycznie wg metody analizy wariancji dla klasyfikacji podwójnej. Istotność różnic w zawartości grup SH i SS z poszczególnych stężeń roztworów zbadano przy użyciu nowego wielokrotnego testu rozstępu Duncana (O k t a b a 1963).

WYNIKI BADAŃ

Użycie metody Barnetta i Seligmana pozwoliło przeanalizować umiejscowienie białkowych grup SH i SS w histogenach korzeni słonecznika kiełkujących w różnych stężeniach soli potasowej i superfosfatu. Dodatni odczyn na białkowe grupy SH i SS występował we wszystkich komórkach poszczególnych histogenów korzeni, różniąc się jednakże natężeniem zabarwienia. Przy wykrywaniu grup SH barwny odczyn wyrażał się dyfuzyjnym szarofioletowym lub ciemnofioletowym zabarwieniem plazmy. W cytoplazmie najintensywniejszy odczyn obserwowano przy błonie jądrowej i błonie komórkowej. W jądrach komórkowych odczyn na SH był równomierny, ale słabszy niż w cytoplazmie. Komórki dermatogenu, kalyptrógeny oraz grupa komórek tworzących tzw. strefę nieaktywną wykazywały najmocniejsze zabarwienie, a komórki peryblemu i pleromu — słabsze. W korzeniach z opóźnionym kiełkowaniem pod wpływem większych stężeń soli potasowej (KCl) (1 %, 0,5 %) zabarwienie plazmy poszczególnych komórek histogenów było mocniejsze w odniesieniu do kontrolnych, a w komórkach korzeni z przyspieszonym kiełkowaniem zabarwienie plazmy było słabsze.

Odczyn barwny przy wykrywaniu grup SS dotyczył również cytoplazmy i można było obserwować czerwony lub czerwono-różowy drobnoziarnisty odczyn, grupujący się przeważnie w cytoplazmie obwodowej, tzn. w strefie pod błoną komórkową. Najmniej ziarenek znajdowało się w strefie przyjądrowej, co stwarzało obraz szerszej lub węższej słabo zabarwionej obwódki dokołajądrowej. W plazmie korzeni z opóźnionym kiełkowaniem zabarwienie było słabsze, a w plazmie korzeni z przyspieszonym kiełkowaniem mocniejsze w odniesieniu do kontrolnych. Wyższą ekstynkcję stwierdzono tam, gdzie występowała większa zawartość grup SH i SS i odwrotnie. Wykonując preparaty kontrolne, w których wyłączono możliwość wejścia w reakcję grup SH za pomocą blokowania kwasem monojodooctowym, otrzymano nieswoiste zabarwienie czernią K, otrzymując barwę brązoworudą. Ekstynkcja

była niższa i wyrażała się we wszystkich preparatach liczbą stałą dla tych samych warstw korzenia. Przy porównywaniu badań grup SH i SS oddzielnie i łącznie, uwzględniając czynnik nieswoistego zabarwienia, okazało się, że wyniki pokrywają się ze sobą. W korzeniach słonecznika kiełkujących w poszczególnych stężeniach soli potasowej (KCl) i superfosfatu uzyskano różne wartości ekstynkcji. Wartości te podano w tabelach i omówiono je oddzielnie dla każdej grupy doświadczalnej.

Grupa doświadczalna A.

Nasiona słonecznika (*Helianthus annuus* L.) poddane kiełkowaniu w roztworach soli potasowej (KCl) w stężeniach: 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,005%, 0,001% i kontrolne w wodzie destylowanej kiełkowały nierównocześnie. Opóźnienie w kiełkowaniu o 2 dni w odniesieniu do kontroli zaobserwowano u nasion w roztworach 1% i 0,5%, natomiast przyspieszenie procesu kiełkowania o 1 dzień wystąpiło u nasion w roztworach o mocniejszym stężeniu: 0,1% i 0,001%. Średnie wartości ekstynkcji grup SH przedstawia tabela 1 A. Z danych ujętych tabelą 1 A wynika, że największa zawartość grup SH (ekstynkcja 0,95) występowała w korzonkach zarodkowych słonecznika, pęczniejących w roztworach 1% i 0,5%, a malała z niewielkimi wahaniami w słabszych stężeniach roztworu. Najniższa wartość ekstynkcji grup SH wynosiła 0,47 w korzeniach z roztworów 0,01% i 0,001%. W korzeniach wykiełkowanych 1-dniowych ekstynkcja grup SH była mniejsza przeciętnie o 0,30, a krzywa wartości biegła niemal równolegle do wartości w korzeniach zarodkowych. W 3-dniowych korzeniach zawartość grup SH była jeszcze niższa (średnio o 0,14) w stężeniach 1%, 0,5% 0,1% i 0,05% w odniesieniu do korzeni jednodniowych i wzrastała w 0,01%, 0,005% i 0,001%.

Średnie wartości ekstynkcji grup SS obrazuje tabela 2 A. Przedstawione w tabeli 2 A dane pozwalają zauważyć, że największe wartości (1,14) posiadały korzenie zarodkowe z roztworu 0,01%. W korzeniach jednodniowych wartość ekstynkcji grup SS w stężeniach 1%, 0,5% i 0,1% była niższa przeciętnie o 0,06 od wartości w korzeniach zarodkowych w tych samych stężeniach roztworów i wzrastała w 0,01%, 0,005% i 0,001%. W 3-dniowych korzeniach najniższa ekstynkcja (0,80) występowała w korzeniach ze stężenia 0,005%, najwyższa zaś w korzeniach ze stężenia 0,1%.

Porównując ilościowe średnie ekstynkcji białkowych grup SH i SS (tabela 1 A i 2 A) w korzeniach słonecznika kiełkujących w roztworach soli potasowej (KCl) o różnych stężeniach daje się zauważyć prawidłowości. W korzeniach kiełkujących z opóźnieniem wartość ekstynkcji

grup SH była wyższa w stosunku do kontrolnych o 0,23, a różnica wartości grup SS w tych korzeniach była mniejsza i wynosiła 0,12. Odwrotnie było w korzeniach z przyspieszonym kiełkowaniem. Wartość ekstynkcji grup SH była niższa o 0,04, a grup SS wyższa o 0,44 w porównaniu z kontrolnymi.

Tab. 1 A. Średnie ekstynkcje białkowych grup SH w korzeniach słonecznika (*Helianthus annuus* L.) kiełkujących w roztworach soli potasowej (KCl)
Average values of extinction of protein-bound SH groups in the roots of *Helianthus annuus* L. which germinated in the solution of KCl

Badanie Grup SH	Stężenie roztworu soli potasowej (KCl)							Kontrola
	1%	0,5%	0,1%	0,05%	0,01%	0,005%	0,001%	
korzenie zarodkowe	0,95	0,95	0,79	0,75	0,47	0,69	0,47	0,54
korzenie 1-dniowe	0,67	0,66	0,58	0,58	0,40	0,45	0,47	0,44
korzenie 3-dniowe	0,62	0,54	0,41	0,36	0,47	0,60	0,67	0,66

Tab. 2 A. Średnie ekstynkcje białkowych grup SS w korzeniach słonecznika (*Helianthus annuus* L.) kiełkujących w roztworach soli potasowej (KCl)
Average values of extinction of protein-bound SS groups in the roots of *Helianthus annuus* L. which germinated in the solution of KCl

Badanie Grup SS	Stężenie roztworu soli potasowej (KCl)							Kontrola
	1%	0,5%	0,1%	0,05%	0,01%	0,005%	0,001%	
korzenie zarodkowe	1,02	1,01	1,01	1,10	1,14	1,07	1,00	0,98
korzenie 1-dniowe	0,96	0,95	0,91	1,04	1,22	1,23	1,10	0,78
korzenie 3-dniowe	1,00	0,97	1,23	1,15	1,08	0,80	0,91	0,93

Grupa doświadczalna B

W tej grupie doświadczalnej przebadano również zawartość białkowych grup SH i oddzielnie SS w korzeniach słonecznika (*Helianthus annuus* L.) kiełkujących w roztworach superfosfatu o stężeniach 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,005%, 0,001%. Kiełkowanie nasion odbywało się niemal równocześnie we wszystkich stężeniach roztworów, a wzrost korzonków był bardzo intensywny. Zaznaczył się jednak szybszy wzrost na długość korzeni ze stężenia 0,005%. Tabela 3 B przedstawia zawartość grup SH w badanych korzeniach. Zawartość białkowych grup SH w korzeniach zarodkowych była stosunkowo niska (średnio 0,42) i małe były

wahania wartości w poszczególnych roztworach. W wykiełkowanych 1-dniowych zawartość spadała przeciętnie o 0,20 w odniesieniu do korzeni zarodkowych. Najniższą wartość (0,12) posiadały korzenie z roztworu 0,005%. Wartość ekstynkcji w korzeniach 3-dniowych wzrastała w stosunku do wartości w korzeniach 1-dniowych średnio o 0,14.

Tab. 3 B. Średnie ekstynkcji białkowych grup SH w korzeniach słonecznika (*Helianthus annuus* L.) kiełkujących w roztworach superfosfatu
Average values of extinction of protein-bound SH groups in the roots of *Helianthus annuus* L. which germinated in the solution of superphosphate

Badanie Grup SH	Stężenie roztworu superfosfatu							Kon- trola
	1%	0,5%	1,0%	0,05%	0,01%	0,005%	0,001%	
korzenie zarodkowe	0,47	0,40	0,42	0,33	0,40	0,46	0,47	0,54
korzenie 1-dniowe	0,23	0,24	0,22	0,25	0,20	0,12	0,16	0,44
korzenie 3-dniowe	0,27	0,40	0,36	0,38	0,31	0,35	0,56	0,66

Tab. 4 B. Średnie ekstynkcji białkowych grup SS w korzeniach słonecznika (*Helianthus annuus* L.) kiełkujących w roztworach superfosfatu
Average values of extinction of protein-bound SS groups in the roots of *Helianthus annuus* L. which germinated in the solution of superphosphate

Badanie Grup SS	Stężenie roztworu superfosfatu							Kon- trola
	1%	0,5%	0,1%	0,05%	0,01%	0,005%	0,001%	
korzenie zarodkowe	1,16	1,19	1,18	1,25	1,29	1,33	1,33	0,98
korzenie 1-dniowe	1,26	1,29	1,26	1,28	1,32	1,35	1,36	0,78
korzenie 3-dniowe	1,34	1,38	1,31	1,38	1,36	1,31	1,30	0,93

Ilość białkowych grup SS w korzeniach słonecznika możemy prześledzić na podstawie wyników zawartych w tabeli 4 B. Najniższą zawartość grup SS posiadały korzenie zarodkowe, a krzywa ich wartości wzrastała w miarę malejących stężeń roztworu. W wykiełkowanych korzeniach 1-dniowych zawartość ta była wyższa i wzrastała średnio o 0,10. Najwyższą zawartość grup SS posiadały korzenie 3-dniowe, a wartość ta była wyższa w stosunku do korzeni zarodkowych o 0,19. Charakterystyczne było, że w roztworze o stężeniu 0,005% zawartość grup SS zarówno w korzeniach zarodkowych, jak i wykiełkowanych 1-dniowych i 3-dniowych osiągała wartość w pobliżu 1,33 i krzywe wykresu zbiegały się w tym punkcie.

Przy zestawieniu ilościowych średnich ekstynkcji białkowych grup z obydwu tabel 3 B i 4 B zauważono dużą dysproporcję w zawartości grup SH i SS w korzeniach słonecznika kiełkujących w tych samych stężeniach superfosfatu. Wartość ekstynkcji grup SH w korzeniach zarodkowych wynosiła 0,42, zaś dla grup SS 1,25. Ponadto obserwowano się w wykiełkowanych korzeniach 1-dniowych ze stężenia 0,005%, u których wzrost na długość był bardzo intensywny, najniższą zawartość grup SH (0,12), podczas gdy ekstynkcja grup SS w tych korzeniach wynosiła 1,35.

Tab. 5 A. Analiza wariancji dla korzeni słonecznika (grupy SH) kiełkujących w roztworach soli potasowej (KCl) (patrz tab. 1 A)
Variance analysis for the roots of *Helianthus annuus* L. (SH groups) germinating in the solution of KCl (see Table 1 A)

Źródło zmienności	Stopień swobody	Suma kwadratów	Średnie kwadratów	F°	F _{0,05}
Stężenie	8—1 = 7	0,9034	0,1290	6,1137	2,14
Korzenie	3—1 = 2	0,6144	0,3072	14,5592	3,13
Interakcja	(8—1) (3—1) = 14	0,7342	0,0524	2,4834	1,84
Błąd	72	1,5217	0,2211		
Całość	n—1 = 95	3,7737			

Tab. 6 A. Analiza wariancji dla korzeni słonecznika (grupy SS) kiełkujących w roztworach soli potasowej (KCl) (patrz tab. 2 A)
Variance analysis for the roots of *Helianthus annuus* L. (SS groups) germinating in the solution of KCl (see Table 2 A)

Źródło zmienności	Stopień swobody	Suma kwadratów	Średnie kwadratów	F°	F _{0,05}
Stężenie	7	0,4053	0,0579	2,0978	2,14
Korzenie	2	0,0073	0,0036	0,1304	3,13
Interakcja	14	0,7329	0,05235	1,8967	1,84
Błąd	72	1,9884	0,0276	—	
Całość	95	35,7219	—	—	

Wyniki uzyskanych badań i ekstynkcji opracowano statystycznie wg metody analizy wariancji dla klasyfikacji podwójnej O k t a b y. Wnioski oparto na porównaniu obliczonej wartości F° z wartością

funkcji testowej, odczytanej z tablic F. Snedecora. Jeżeli obliczona wartość F^0 była większa od wartości funkcji testowej $F_{0,05}$, wówczas stwierdzano istotne różnice w zawartości grup SH lub SS w korzeniach z poszczególnych stężeń roztworów oraz między kiełkującymi korzeniami z ryzykiem błędu mniejszym niż 5%. Wyniki uzyskane z 4 analiz wariancji zebrano w tabelach 5 A — 8 B.

Tab. 7 B. Analiza wariancji dla korzeni słonecznika (grupy SH) kiełkujących w roztworach superfosfatu (patrz tab. 3 B)
Variance analysis for the roots of *Helianthus annuus* L. (SH groups) germinating in the solution of superphosphate (see Table 3 B)

Źródło zmienności	Stopień swobody	Suma kwadratów	Średnie kwadratów	F^0	$F_{0,05}$
Stężenie	7	0,0909	0,0129	0,5489	2,14
Korzenie	2	0,7099	0,3549	15,1021	3,13
Interakcja	14	0,2458	0,01767	0,7489	1,84
Błąd	72	1,6923	0,0235	—	—
Całość	95	2,7389	—	—	—

Tab. 8 B. Analiza wariancji dla korzeni słonecznika (grupy SS) kiełkujących w roztworach superfosfatu (patrz tab. 4 B)
Variance analysis for the roots of *Helianthus annuus* L. (SS groups) germinating in the solution of superphosphate (see Table 4 B)

Źródło zmienności	Stopień swobody	Suma kwadratów	Średnie kwadratów	F^0	$F_{0,50}$
Stężenie	7	0,1223	0,0174	0,6718	2,14
Korzenie	2	0,0405	0,0202	0,7799	3,13
Interakcja	14	0,2240	0,0160	0,6177	1,84
Błąd	72	1,1864	0,0259	—	—
Całość	95	1,5732	—	—	—

Wnioski do tabeli 5 A:

1. Stwierdzono istotne różnice w zawartości grup SH w korzeniach z poszczególnych stężeń roztworów soli potasowej (KCl).
2. Stwierdzono istotne różnice w zawartości grup SH w korzeniach zarodkowych, 1-dniowych i 3-dniowych.
3. Interakcja istotna.

Wnioski do tabeli 6 A:

1. Nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości grup SS w korzeniach z poszczególnych stężeń roztworów soli potasowej.
2. Nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości grup SS w korzeniach zarodkowych, 1-dniowych i 3-dniowych.
3. Interakcja istotna.

Wnioski do tabeli 7 B.

1. Nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości grup SH w korzeniach z poszczególnych stężeń roztworów superfosfatu.
2. Stwierdzono istotne różnice w zawartości grup SH w korzeniach zarodkowych, 1-dniowych i 3-dniowych.
3. Interakcja nieistotna.

Wnioski do tabeli 8 B.

1. Nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości grup SS w korzeniach z poszczególnych stężeń superfosfatu.
2. Nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości grup SS w korzeniach zarodkowych, 1-dniowych i 3-dniowych.
3. Interakcja nieistotna.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Zastosowanie do badań siarki radioaktywnej o względnie intensywnym promieniowaniu i otrzymane w wyniku radioautogramy pozwoliły Harrisonowi (1944) i Thomasowi (1948) donieść, że największe nagromadzenie siarki w pszenicy i pomidorach znajdowało się w rozwijającym się zarodku, a następnie omówić rozdział na poszczególne warstwy tkanek. Roberts i Lucchese (1955), posługując się zmodyfikowaną metodą nitroprusydkową, wykazali w protoksylenie epikotyli *Zea mays* L. zabarwione białkowe grupy SH. Badaniom tym przeczą obserwacje Tiefela (1957), któremu nie udało się wykazać umiejscowienia tych grup w różnicujących się elementach ksylemu. Młode tkanki w zasadzie posiadają dużo białkowych grup sulfhydrylowych, o czym zresztą można się było przekonać w toku naszych poprzednich i obecnych badań histochemicznych. W obrębie histogenów najwyższą zawartość białkowych grup SH wykazywały komórki dermatogenu, kalyptrógeny i komórki tworzące tzw. centrum nieczynne. W komórkach pleromu, z których następnie tworzą się elementy przewodzące, a więc gdzie zachodzą szybkie przemiany, zawartość badanych grup była niska. Przy wykrywaniu grup SS zaobserwowano najwyższą ich zawartość w komórkach pleromu, małą w komórkach peryblemu, dermatogenu, kalyptrógeny i centrum nieczynnego. Należy podkreślić, że w komórkach korzeni z opóźnionym kiełkowaniem pod

wpływem dużych stężeń użytych w doświadczeniu roztworów można było zauważyć najwyższą zawartość grup SH, a najniższą grup SS w odróżnieniu od komórek korzeni z przyspieszonym kiełkowaniem, w których występował odwrotny stosunek grup SH i SS. W przedstawionej pracy badano również wpływ różnych stężeń roztworów KCl i superfosfatu na zawartość białkowych grup SS i SH w merystematycznych komórkach w przebiegu kiełkowania. Zmienność występowania grup SH i SS można było wyrazić także stosunkiem liczbowym jednych do drugich. Uzasadnieniem naszych spostrzeżeń mogą być również wyniki badań uzyskane przy użytych stężeniach roztworów superfosfatu, które nie wykazywały działania hamującego. Kiełkowanie ulegało przyspieszeniu, przy czym zaznaczała się przewaga grup SS oraz nie zaznaczały się wyraźne różnice w zawartości grup SH i SS w korzeniach z poszczególnych stężeń roztworów.

Nasze badania histofotometryczne były potwierdzeniem obserwacji cyto- i histochemicznych. Białkowe grupy SH, zabarwione wg metody Barnetta i Seligmana ujawniły się przede wszystkim w cytoplazmie komórki, dając najsilniejsze zabarwienie strefy obwodowej i strefy przyjądrowej. Jądro komórki dawało również odczyn histochemiczny dodatni, nie pozwolił on jednak na przeprowadzenie dokładnej analizy struktur jądrowych. Roberts (1960) również na podstawie swoich badań nie mógł ustalić czy zabarwienie jąder ograniczyło się tylko do jego struktur. Stern (1959) także nie wykrywa wyraźnej reakcji barwnej białkowych grup SH w jądrze i jąderku, natomiast Idelman (1957) opisał odczyn histochemiczny na białkowe grupy SH na powierzchniach struktur jądrowych.

W dostępnej mi literaturze nie znaleziono prac, które zajmowałyby się histochemicznym wykazywaniem grup SS w cytoplazmie komórek merystematycznych. W naszych badaniach, wykonanych wg metody Barnetta i Seligmana (1954) można było przeanalizować umiejscowienie tych grup w komórce. Okazuje się, że najsilniejszy odczyn barwny uzyskano w szerokiej strefie obwodowej cytoplazmy przy czym odczyn ten wyraźnie zmniejszał się w kierunku dojądrowym a nawet na niektórych preparatach nie obserwowano się grup SS w strefie przyjądrowej i jądrze.

Nasze fotometryczne i histochemiczne badania nie pozwoliły na przeprowadzenie wyczerpującej analizy fizjologicznej i chemicznej. Zastosowanie metody Barnetta i Seligmana, jako w tej chwili jedynej specyficznej i najbardziej dokładnej metody barwnego wykrywania białkowych grup SH i SS w połączeniu z fotometrycznym określeniem ich ilości, może jedynie pozwolić na wyznaczenie wskaź-

nika stosunku, w jakim pozostają względem siebie badane grupy sulfhydrylowe w młodych tkankach, a przede wszystkim w merystematycznych komórkach kiełkujących korzeni. Wskaźnik ten w badaniach kontrolnych dla korzeni zarodkowych słonecznika wynosił 1,7, jednodniowych 1,8 i trzydniowych 1,4. Działanie różnych stężeń soli potasowej, które wywierały wpływ hamujący, np. 1% pozwoliło na wyznaczenie wskaźnika: dla korzeni zarodkowych 1,0; dla jednodniowych 1,4 i dla trzydniowych 1,6. Wskaźnik dla korzeni z przyspieszonym wzrostem z 0,001% stężenia roztworu soli potasowej wynosił dla korzeni zarodkowych 2,8, dla jednodniowych 8,5 i dla trzydniowych 8,6.

Porównanie omawianego wskaźnika stosunku białkowych grup SH i SS dla korzeni zarodkowych i wykiełkowanych jednodniowych pozwoliło zauważyć, że w miarę wzrostu korzenia wskaźnik ten również wzrastał. Przy opóźnionym kiełkowaniu wskaźnik był niższy a przy przyspieszonym wyższy. Poznanie wskaźnika stosunku białkowych grup SH i SS w młodych tkankach roślinnych może stać się jednym z ogniw analizy procesów odbywających się w komórce. Lisowski (1956) bowiem uważa, że grupy sulfhydrylowe związane ze strukturą białek utrzymują aktywność komórek, umożliwiając ich wzrost i rozmnażanie się.

WNIOSKI

Barwny odczyn białkowych grup SH w cytoplazmie merystematycznych komórek jest najsilniejszy w strefach obwodowej i przyjądrowej komórki. Barwny odczyn na grupy SS jest najwyraźniejszy tylko w strefie obwodowej cytoplazmy.

2. W obrębie histogenów badanych korzeni najsilniejsze zabarwienie białkowych grup SH wykazywały komórki dermatogenu, kaliptrogenu i komórki tworzące tzw. centrum nieczynne. Najsilniejsze zabarwienie grup SS natomiast wystąpiło w komórkach pleromu, w innych histogenach odczyn był słaby.

3. Przyspieszenie procesu kiełkowania i wzrostu korzeni pod wpływem niskich stężeń roztworów KCl zaznacza się zwiększoną ilością grup SS w porównaniu z grupami SH.

4. Opóźnienie procesu kiełkowania i wzrostu korzeni pod wpływem wyższych stężeń roztworów KCl zaznacza się zwiększoną ilością grup SH w odniesieniu do grup SS.

5. Przy zastosowanych stężeniach roztworów superfosfatu nie wystąpiły istotne różnice w zawartości grup SH i SS w kiełkujących korzeniach.

6. Stosunek ilościowy białkowych grup SH do SS może być wskaźnikiem procesów odbywających się w komórkach merystematycznych korzeni.

PIŚMIENICTWO

1. Barnett R. J., Seligman A. M.: Science **116**, 323—327, 1952.
2. Barnett R. J., Seligman A. M.: J. Nat. Cancer Inst., **14**, 769—804, 1954.
3. Bennett H. S.: Anat. Rec. **110**, 231—246, 1951.
4. Carfuny E. J., Di Stefano H. S., Farach A.: J. Histochem. Cytochem. **5**, 354—360, 1955.
5. Findlay G. H.: J. Histochem. Cytochem. **5**, 331—338, 1955.
6. Harrison B. F., Thomas M. D., Hill G. R.: Plant Physiol. **19**, 245—257, 1944 wg Ruhland W.: Handbuch der Pflanzenphysiologie t. 9. Der Stoffwechsel der Schwefel- und Phosphorhaltigen Verbindungen. Springer-Verlag, Berlin 1958.
7. Idelman S.: Compt. Rend. Acad. Sci. Paris. **244**, 1827—1828, wg Roberts L. W.: Amer. Journal of Botany, **47**, 111—114, 1960.
8. Kudejko T.: Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Sec. D, **19**, 163—174, Lublin 1964.
9. Lisowski J.: Postępy Hig. i Med. Dośw. **10**, 401—429, 1956.
10. Miłkowska J.: Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Sec. D, **16**, 441—445, Lublin 1961.
11. Miłkowska J.: Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Sec. D, **17**, 325—331, Lublin 1962.
12. Oktaba W.: Elementy statystyki matematycznej i teoria doświadczenia. PWN, Warszawa—Łódź 1963.
13. Roberts L. W.: Amer. Journal of Botany. **47**, 111—114, 1960.
14. Roberts L. W., Lucchese G.: Stain Tech. **30**, 291—298, 1955.
15. Rittner C., Di Stefano H. S., Farach A.: J. Histochem. **9**, 97—102, 1961.
16. Stern H.: Bot. Rev. **25**, 351—384, 1959.
17. Thomas M. D.: Proc. Auburn Conference on Use of Radioactive Isotopes in Agricultural Research. Auburn, Ala. 1948 wg Ruhland W.: Handbuch der Pflanzenphysiologie, t. 9. Der Stoffwechsel der Schwefel- und Phosphorhaltigen Verbindungen. Springer—Verlag, Berlin 1958.
18. Tieffel R. M.: Histochemical Differentiation of Meristems. Ph. D. Dissertation. Univ. Missouri. Columbia 1957, wg Roberts L. W. (13).

РЕЗЮМЕ

Исследования произведены на эмбриональных, однодневных и трехдневных корнях подсолнечника (*Helianthus annuus* L.), прорастающих в различных концентрациях растворов калийной соли (KCl) и суперфосфата. Применение метода Барнетта и Селигмана

для выявления белковых групп SH и SS в соединении с фотометрическим определением их количества дало возможность обозначить показатель отношения исследуемых сульфгидрильных групп в меристематических клетках прорастающих корней. По мере роста корня этот показатель увеличивался, в случаях замедленного прорастания становился более низким, а при сокращенном прорастании — более высоким.

Табл. 1 А. Средние экстинкции белковых групп SH в корнях подсолнечника (*Helianthus annuus* L.), прораставших в растворах калийной соли (KCl).

Табл. 2 А. Средние экстинкции белковых групп SS в корнях подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) прораставших в растворах калийной соли (KCl).

Табл. 3 В. Средние экстинкции белковых групп SH в корнях подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) прораставших в растворах суперфосфата.

Табл. 4 В. Средние экстинкции белковых групп SS в корнях подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) прораставших в растворах суперфосфата.

Табл. 5 А. Анализ вариаций для корней подсолнечника (группы SH), прораставших в растворах калийной соли (KCl). (См. табл. 1 А).

Табл. 6 А. Анализ вариаций для корней подсолнечника (группы SS), прораставших в растворах калийной соли (KCl). (См. табл. 2 А).

Табл. 7 В. Анализ вариаций для корней подсолнечника (группы SH), прораставших в растворах суперфосфата. (См. табл. 3 В).

Табл. 8 В. Анализ вариаций для корней подсолнечника (группы SS), прораставших в растворах суперфосфата. (См. табл. 4 В).

S U M M A R Y

Investigations were carried out on one-day and 3-day-old embryo roots of *Helianthus annuus* L. which germinated at different concentrations of KCl and superphosphate. The index of interdependence of both sulfhydryl groups in the meristematic cells of germinating roots was determined using Barnett and Seligman's method, for detecting SH and SS protein groups, and a Zeiss photometer for estimating their quantity. The index increased as the roots grew up; if the germination process was delayed the index decreased, if it was accelerated the index increased.

Prace otrzymano 15 III 1964.

