

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE - SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XIX, 56

SECTIO D

1964

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie

Kierownik: prof. dr med. Stanisław Grzycki

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej. Wydział Farmaceutyczny.

Akademia Medyczna w Lublinie

Kierownik: doc. dr Tadeusz Szyal

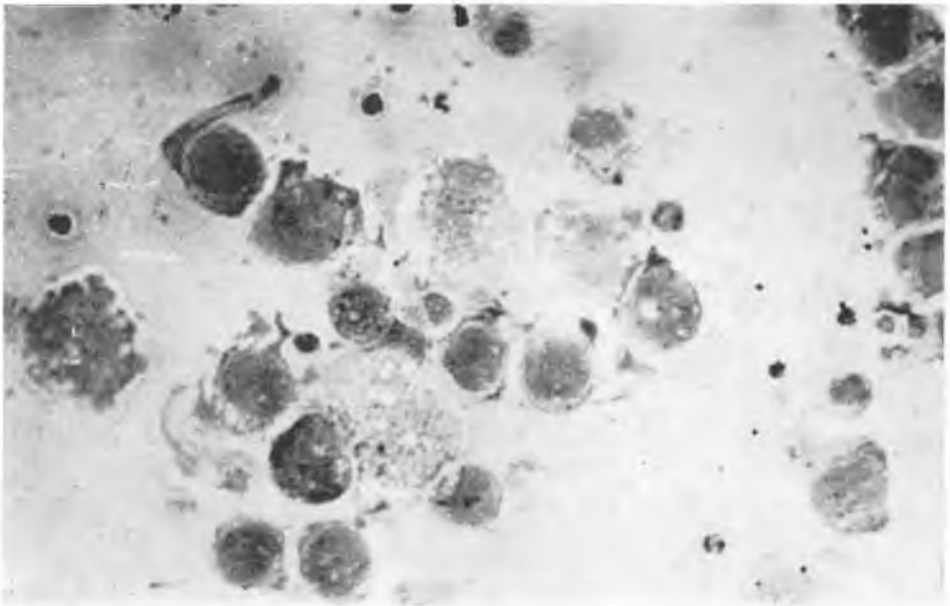
Jadwiga MIŁKOWSKA

Białkowe grupy SH i SS w merystematycznych komórkach korzeni łubinu
(*Lupinus luteus* L.).

Белковые группы SH и SS в меристематических клетках корней
желтого люпина (*Lupinus luteus* L.)

Protein Bound SH and SS Groups in the Meristematic Root Cells
of *Lupinus luteus* L.

Wśród licznych prac na temat grup sulfhydrylowych (glutation i SH związane z białkiem), ich znaczenia i udziału w przebiegu wielu procesów żywej tkanki, większość dotyczy komórki zwierzęcej. Białkowymi grupami SH w komórce roślinnej zajmowali się: Brachet (1950), Mazia (1954) a przede wszystkim Roberts (1951, 1956, 1960), Roberts i Lucchese (1955), Tiefel (1957), Stern (1956) oraz Miłkowska (1961, 1962, 1963, 1964). Roberts, posługując się w badaniach histochemicznych odczynnikiem 4-jodoacetamido-1naftolem (IAN), obserwował w promerystemie zarodka korzenia *Zea mays* L. najwyższe stężenie białkowych grup związanych z SH, a zmniejszanie się zawartości tych grup w miarę oddalania się od wierzchołka. W innych pracach Roberts (1960) przeprowadzał badania nad zmianami stężenia SH w czasie podziału komórki na zranionym merystemie łodygi *Coleus blumei* Benth. przy czym posługiwał się metodą Bennetta, używając odczynnika 1-/4-chlorortęciofeniloazo/naftolu-2 (Mercury Orange), a także odczynnika dwusiarczku 2,2-dwuhydroksy-6,6 dwunaftylowego (DDD) wg metody Barnetta i Seligmana. W wyniku przeprowadzonych badań Roberts doszedł do przekonania, że nie ma wyraźnych różnic w stężeniu białkowych grup SH przed podziałem i bezpośrednio po podziałach komórek, natomiast w okolicach podziału w obrębie zranionego merystemu odczyn histochemiczny był wyraźny. Mazia (1954) stwierdził, że białkowe grupy SH mogą mieć funkcję strukturalną przez tworzenie powiązań disulfidowych we wrzecionie mitotycznym. Nie mógł jednak znaleźć wyraźnej różnicy w zabarwieniu białkowych grup SH między cytoplazmą nie dzielących się komórek



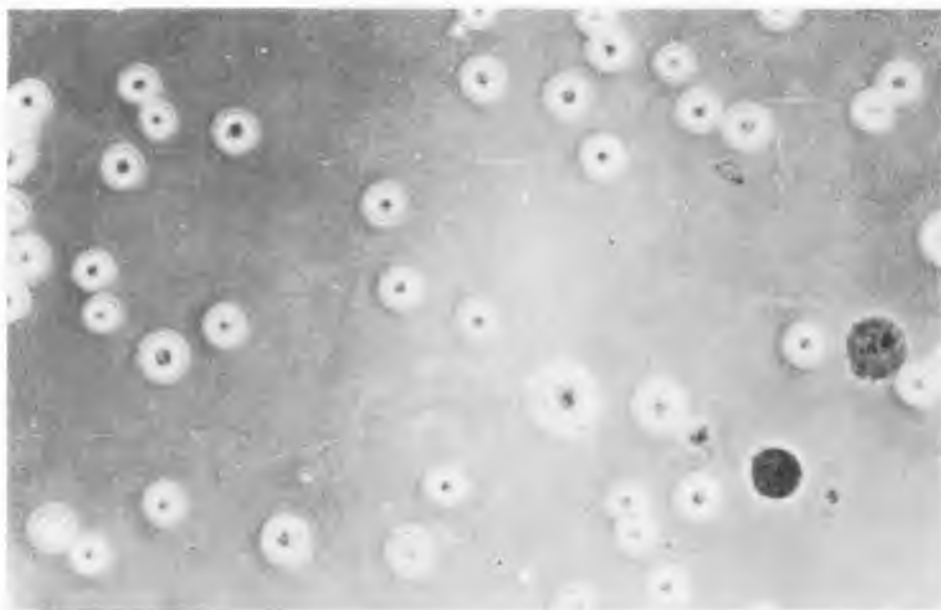
Ryc. 5



Ryc. 6



Ryc. 7



Ryc. 8

a komórkami w różnych stadiach mitozy, kiedy używał metody histochemicznej Barnetta i Seligmana. Brachet (1950) wykazał, że utlenianie białkowych grup SH na dwusiarczek powoduje rozpoczęcie mitozy. Stern (1956) badał pylniki *Lilium longiflorum* var. Croft na zawartość białkowych grup SH w 11-dniowym okresie mitozy mikrospor. Oznaczone amperometrycznie białkowe grupy SH nie wykazywały żadnej wyraźnej zmiany w stężeniu podczas mitozy badanych mikrospor. Miłkowska (1963, 1964) zajmowała się przede wszystkim rozmieszczeniem odczynów barwnych białkowych grup SH i SS w merystematycznych komórkach korzeni *Zea mays* L. i *Helianthus annuus* L. oraz badała wpływ zmian środowiska i temperatury na zawartość tych grup.

W obecnej pracy przebadano histochemicznie i histofotometrycznie białkowe grupy SH i SS w merystematycznych komórkach korzeni łubinu (*Lupinus luteus* L.) kiełkujących w różnych stężeniach roztworów soli potasowej (KCl) i superfosfatu.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Badaniom histochemicznym poddano korzenie zarodkowe oraz 1-dniowe i 3-dniowe łubinu (*Lupinus luteus* 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 %. Przebadano zawartość grup SH, a następnie SS w korzeniach łubinu: kiełkujących pod wpływem różnych stężeń roztworów soli potasowej oraz kiełkujących pod wpływem różnych stężeń roztworów superfosfatu. Pobrano do badań histochemicznych materiał utrwalano i barwiono wg metody Barnetta i Seligmana (1952) stosownie do postępowania opracowanego przez nas poprzednio (Miłkowska 1964). 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 (Okta 1963).

WYNIKI BADAŃ

Zastosowanie metody Barnetta i Seligmana pozwoliło przeanalizować umiejscowienie białkowych grup SH i SS w histogenach korzeni łubinu, 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, kalitrogenu 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 (1 %, 0,5 %) zabarwienie plazmy poszczególnych komórek histogenów było mocniejsze w odnie-

sieniu do kontrolnych, a w komórkach korzeni z przyspieszonym kiełkowaniem zabarwienie plazmy było słabsze.

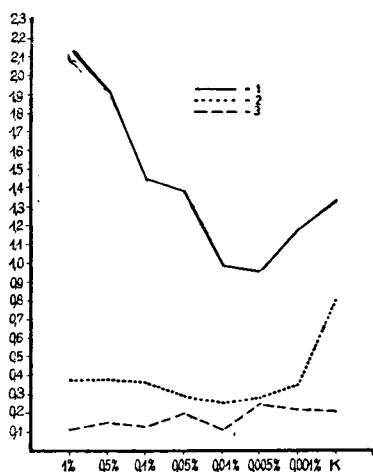
Odczyn barwny przy wykrywaniu grup SS dotyczył również cytoplazmy i można było obserwować czerwony lub czerwono-różowy drobnoziarnisty odczyn grupujący się przeważnie w cytoplazmie obwodowej, tzn. w strefie pod błoną komórkową. Najmniej ziarenek znajdowało się w strefie przyjądrowej, co stwarzało obraz szerszej lub węższej, słabo zabarwionej obwódki dokołajądrowej. W plazmie korzeni z opóźnionym kiełkowaniem zabarwienie było słabsze a w plazmie komórek 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 barwy brązowo-rudej. Ekstynkcja była niższa i wyrażała się we wszystkich preparatach liczbą stałą dla tych warstw korzenia. Przy porównywaniu badań grup SH i SS oddzielnie i łącznie, uwzględniając czynnik nieswoistego zabarwienia stwierdzono, że wyniki pokrywają się ze sobą. W korzeniach łubinu kiełkujących w poszczególnych stężeniach soli potasowej (KCl) i superfosfatu uzyskano różne wartości ekstynkcji. Wartości te przedstawiono graficznie na 4 rycinach i omówiono je oddzielnie dla każdej grupy doświadczalnej.

1 grupa doświadczalna.

Przebadano wpływ roztworów soli potasowej (KCl) o różnych stężeniach na zawartość grup SH i SS w korzeniach łubinu. Znaczne opóźnienie kiełkowania nasion o 3 dni w odniesieniu do kontrolnych wystąpiło w roztworach soli potasowej w stężeniach 1 % i 0,5 %. Wcześniej natomiast od kontrolnych o 1 dzień wykiełkowały nasiona w roztworze 0,005 % i 0,01 %. Wartość ekstynkcji grup SH przedstawiono na ryc. 1. Krzywa ekstynkcji grup SH w korzeniach zarodkowych opadała stopniowo od najwyższej wartości (2,12) w korzeniach przy stężeniu 1 % roztworu do wartości 0,95 w korzeniach w roztworze 0,005 %. Następnie wzrastała (1,18) w korzeniach z roztworu 0,001 %, podczas gdy ekstynkcja w korzeniach kontrolnych wynosiła 1,33. W wykiełkowanych korzeniach 1-dniowych wartość ekstynkcji grup SH spadała średnio o 1,10 w odniesieniu do zarodkowych i najniższe wartości posiadały korzenie z roztworów 0,01 % (0,26) i 0,005 % (0,28). Wartość ekstynkcji była jeszcze niższa w korzeniach 3-dniowych, przeciętnie o 0,15 w odniesieniu do 1-dniowych. Zawartość grup SS w kiełkujących korzeniach łubinu jest uwidoczniiona na ryc. 2.

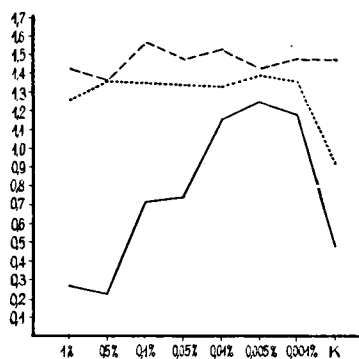
2 grupa doświadczalna.

Jak wynika z ryc. 2, najniższą wartość grup SS posiadały korzenie zarodkowe pęczniące w roztworach o stężeniu 0,5 % (0,22) i 1 % (0,26). W miarę zmniejszania się stężeń wartość ekstynkcji grup SS wzrastała i osiągała w 0,005 % najwyższą wartość: 1,24. W wykiełkowanych korzeniach jednodniowych średnie wartości ekstynkcji grup SS były wyższe w odniesieniu do odpowiednich wartości korzeni zarodkowych. Krzywa ich wartości przebiegała niemal poziomo, osiągając najniższą wartość przy stężeniu 1 % (1,25), najwyższą zaś w 0,005 % (1,38). Różnica średnich wartości grup SS w korzeniach 1-dniowych i 3-dniowych była niewielka na korzyść tych ostatnich.



Ryc. 1. Zawartość białkowych grup SH w korzeniach zarodkowych, 1-dniowych i 3-dniowych łubinu (*Lupinus luteus* L.) w zależności od różnych stężeń soli potasowej (KCl); a — korzenie zarodkowe, b — korzenie 1-dniowe, c — korzenie 3-dniowe.

The effect of different concentrations of KCl on the content of protein-bound SH groups in 1-day and 3-day-old embryo roots of *Lupinus luteus* L.; a — embryo roots, b — 1-day-old roots, c — 3-day-old roots.



Ryc. 2. Zawartość białkowych grup SS w korzeniach zarodkowych, 1-dniowych i 3-dniowych łubinu (*Lupinus luteus* L.) w zależności od różnych stężeń roztworów soli potasowej (KCl); oznaczenia zob. ryc. 1

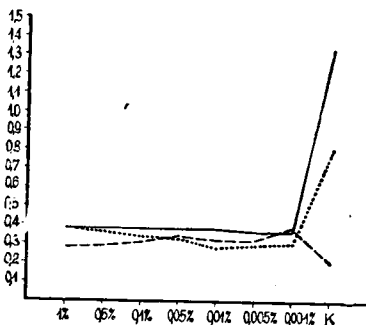
The effect of different concentrations of KCl on the content of protein-bound SS groups in 1-day and 3-day-old embryo roots of *Lupinus luteus* L.; explanations as in Fig. 1

W zestawieniu ekstynkcji białkowych grup SH i SS (ryc. 1 i 2) w kiełkujących korzeniach łubinu w roztworach soli potasowej (KCl) zauważa się, że korzenie o opóźnionym kiełkowaniu (stężenie roztworów 1 % i 0,5 %) posiadały wyższe wartości grup SH w porównaniu z kon-

trólą o 0,42, a grupy SS o 0,74. W korzeniach z przyspieszonym kiełkowaniem różnica wartości SH w odniesieniu do kontroli wynosiła 0,53, a grupy SS 0,47.

3 grupa doświadczalna.

Trzecia grupa doświadczalna obejmowała badania zawartości białkowych grup SH w korzeniach łubinu kiełkujących w roztworach superfosfatu. Niezauważono większych różnic w szybkości kiełkowania nasion w roztworach o różnych stężeniach. Wyniki uzyskane w tej grupie doświadczalnej nie pozwalały dostrzec większych różnic w zawartości grup SH w korzeniach kiełkujących w różnych stężeniach roztworu (ryc. 3). Wartości grup SH zarówno w korzeniach zarodkowych, jak i wykiełkowanych 1- i 3-dniowych były niższe od kontrolnych. Duża różnica wartości ekstynkcji grup SH w odniesieniu do kontroli zaznaczyła się w korzeniach zarodkowych (średnio o 0,96) i w wykiełkowanych korzeniach 1-dniowych średnio o 0,47.



Ryc. 3 Zawartość białkowych grup SH w korzeniach zarodkowych, 1-dniowych i 3-dniowych łubinu (*Lupinus luteus* L.) w zależności od różnych stężeń roztworów superfosfatu; oznaczenia zob. ryc. 1

The effect of different concentrations of superphosphate on the content of protein-bound SH groups in 1-day and 3-day-old embryo roots of *Lupinus luteus* L.; explanations as in Fig. 1



Ryc. 4. Zawartość białkowych grup SS w korzeniach zarodkowych, 1-dniowych i 3-dniowych łubinu (*Lupinus luteus* L.) w zależności od różnych stężeń roztworów superfosfatu; oznaczenia zob. ryc. 1

The effect of different concentrations of superphosphate on the content of protein-bound SS groups in 1-day and 3-day-old embryo roots of *Lupinus luteus* L.; explanations as in Fig. 1

4 grupa doświadczalna.

W grupie tej przebadano zawartość białkowych grup SS w korzeniach łubinu kiełkujących w roztworach superfosfatu. Najniższą wartość grup SS posiadały korzenie zarodkowe, wartości te były jednak wyższe

od kontrolnych średnio o 0,69. W wykiełkowanych 1-dniowych ekstynkacja grup SS nieznacznie wzrastała, a krzywa ich wartości biegła niemal równoległe do wartości w korzeniach zarodkowych. Najwyższa ekstynkacja grup SS występowała w korzeniach 3-dniowych, wykiełkowanych w roztworze 0,005 % (ryc. 4).

W wynikach ujętych ryc. 3 i 4 zauważa się znaczne różnice w zawartości grup SH i SS w korzeniach łubinu kiełkujących w roztworze superfosfatu. Wartość ekstynkcji grup SH w korzeniach zarodkowych wynosiła średnio 0,37, podczas gdy ekstynkacja grup SS w tych samych korzeniach wynosiła 1,17.

Wyniki uzyskanych badań i ekstynkcji opracowano statystycznie wg metody analizy wariancji dla klasyfikacji podwójnej (O k t a b a 1963). Wnioski oparto na porównaniu obliczonej wartości F° z wartością funkcji testowej, odczytanej z tablic F. Snedecora. Jeżeli obliczona wartość F° 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 ujęto wnioskami: A, B, C i D.

A. Analiza wariancji dla korzeni łubinu (grupy SH) kiełkujących w roztworach soli potasowej (patrz ryc. 1).

Wnioski:

1. Stwierdzono istotne różnice w zawartości grup SH w korzeniach z poszczególnych stężeń roztworów soli potasowej.

2. Stwierdzono istotne różnice w zawartości grup SH w korzeniach zarodkowych, 1- i 3-dniowych.

3. Interakcja istotna.

B. Analiza wariancji dla korzeni łubinu (grupy SS) kiełkujących w roztworach soli potasowej (patrz ryc. 2).

Wnioski:

1. Stwierdzono istotne różnice w zawartości grup SS w korzeniach z poszczególnych stężeń roztworów soli potasowej.

2. Stwierdzono istotne różnice w zawartości grup SS w korzeniach zarodkowych, 1- i 3-dniowych.

3. Interakcja istotna.

C. Analiza wariancji dla korzeni łubinu (grupy SH) kiełkujących w roztworach superfosfatu (patrz ryc. 3).

Wnioski:

1. Nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości grup SH w korzeniach z poszczególnych stężeń superfosfatu.

2. Stwierdzono istotne różnice w zawartości grup SH w korzeniach zarodkowych, 1- i 3-dniowych.

3. Interakcja nieistotna.

D. Analiza wariancji dla korzeni łubinu (grupy SS) kiełkujących w roztworach superfosfatu (patrz ryc 4).

Wnioski:

1. Nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości grup SS w korzeniach z poszczególnych stężeń roztworów superfosfatu

2. Istotne różnice stwierdzono w zawartości grup SS w korzeniach zarodkowych, 1- i 3-dniowych.

3. Interakcja nieistotna.

Celem zbadania istotności różnic w zawartości grup SH i SS w korzeniach z poszczególnych stężeń roztworów posłużono się nowym wielokrotnym testem rozstępu Duncana (O k t a b a 1963). Otrzymane dane przy użyciu tego testu potwierdzają uzyskane wyniki ilościowych badań grup SH i SS ujęte wnioskami.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Tkanki merystematyczne posiadają w zasadzie dużo białkowych grup sulfhydrylowych o czym zresztą można się było przekonać w toku naszych poprzednich i obecnych badań histochemicznych. W obrębie histogenów największą zawartość białkowych grup SH wykazują komórki dermatogenu, kaliptrogenu i komórki tworzące tzw. centrum nieczynne. W komórkach pleromu 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. W komórkach korzeni z opóźnionym kiełkowaniem pod wpływem dużych stężeń użytych w doświadczeniu roztworów można było zauważyć największą zawartość grup SH, a najniższą grup SS w odróżnieniu od komórek korzeni z przyspieszonym kiełkowaniem, w których występował odwrotny stosunek grup SS i SH.

Zastosowanie metody Barnetta i Seligmana jako specyficznej metody barwnego wykrywania białkowych grup SH i SS w połączeniu z fotometrycznym określeniem ich ilości pozwoliło na wyznaczenie wskaźnika stosunku, w jakim pozostają względem siebie badane grupy sulfhydrylowe w merystematycznych komórkach kiełkujących korzeni. Wskaźnik ten w badaniach kontrolnych dla łubinu wynosił: dla korzeni zarodkowych 0,36, dla jednodniowych 1,15, a dla trzydniowych 7,00. Działanie różnych stężeń soli potasowej, które wywierały wpływ hamujący np. 1 % pozwoliło na wyznaczenie wskaźnika dla łubinu: dla korzeni za-

rodkowych 0,12, dla jednodniowych 3,3, a dla trzydniowych 13,0. Wskaźnik dla korzeni łubinu z przyśpieszonym wzrostem z 0,001 % stężenia roztworu soli potasowej wynosił dla korzeni zarodkowych 1,0, dla korzeni jednodniowych 4,0 i dla trzydniowych 6,7.

Porównanie omawianego wskaźnika stosunku białkowych grup SH i SS dla korzeni zarodkowych i wykiełkowanych łubinu pozwoliło zauważyć, że podobne wyniki uzyskano przy badaniu korzeni słonecznika (Miłkowska 1964). W miarę wzrostu korzenia wskaźnik ten wzrastał. Przy opóźnionym kiełkowaniu wskaźnik był niższy, a przy przyspieszonym wyższy.

PIŚMIENNICTWO

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. Brachet J.: *Chemical Embriology*, Interscience New York 1950.
5. Mazia D.: SH and growth. *In* Glutathione. Colowick, S. et al (Ed.) Academic Press. Inc. New York 1954.
6. Miłkowska J.: *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska. Lublin. Sec. D.* **16**, 441—445, 1961.
7. Miłkowska J.: *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska. Lublin. Sec. D.* **17**, 325—331, 1962.
8. Miłkowska J.: *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska. Lublin. Sec. D.* **18**, 479—486, 1963.
9. Miłkowska J.: *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska. Lublin. Sec. D.* **19**, 441—454, 1964.
10. Oktaba W.: *Elementy statystyki matematycznej i teoria doświadczenia*. PWN, Warszawa — Łódź 1963.
11. Roberts L. W.: *Science* **124**, 628, 1956.
12. Roberts L. W.: *Science*, **113**, 692—693, 1951.
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. Stern H.: *Science* **124**, 1292—1293, 1956.
16. Stern H.: *Bot. Rev.* **25**, 351—384, 1959.
17. Tiefel R. M.: *Histochemical Differentiation of Meristems*. Ph. D. Dissertation. Univ. Missouri. Columbia 1957, wg Roberts L. W (13).

РЕЗЮМЕ

Для обнаруживания белковых групп SH и SS был использован метод Барнетта и Селигмана, при определении же белковых групп употреблен фотометр Цейсса. Обследованы зародышевые корни однодневные и трехдневные желтого люпина (*Lupinus luteus* L.). На

основании исследований отмечено, что коэффициент отношения белковых групп SH к белковым группам SS увеличивался по мере роста исследуемых корней. При замедленном прорастании коэффициент становился более низким, при ускоренном — более высоким.

Рис. 1. Содержание белковых групп SH в зародышевых корнях, одно- и трехдневных, желтого люпина (*Lupinus luteus* L.) в зависимости от различных концентраций растворов калийной соли (KCl).

Рис. 2. Содержание белковых групп SS в зародышевых корнях, одно- и трехдневных желтого люпина (*Lupinus luteus* L.) в зависимости от различных концентраций растворов калийной соли (KCl).

Рис. 3. Содержание белковых групп SH в зародышевых корнях, одно- и трехдневных желтого люпина (*Lupinus luteus* L.) в зависимости от различных концентраций растворов суперфосфата.

Рис. 4. Содержание белковых групп SS в зародышевых корнях, одно- и трехдневных желтого люпина (*Lupinus luteus* L.) в зависимости от различных концентраций растворов суперфосфата.

SUMMARY

Barnett and Seligman's method was used for detecting protein-bound SH and SS groups. Their quantitative estimation was carried out with a Zeiss photometer. Investigations were carried out on one-day and three-day-old embryo roots of *Lupinus luteus* L. The results showed that the index of interdependence of both sulfhydryl groups increased as the roots grew up. If the germination process was delayed the index decreased, if it was accelerated the index increased.

Pracę otrzymano 20 IV 1964.

