

Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna w Lublinie

Kierownik: doc. dr hab. Tadeusz Szynal

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Pracownia Mikroskopii Elektronowej, Wydział Lekarski,

Akademia Medyczna w Lublinie

Kierownik: prof. dr hab. Stanisław Grzycki

Kazimiera GRZYCKA i Daniela OBUCHOWSKA

Wpływ soku czosnkowego na komórki merystematyczne korzeni *Allium cepa* L.

Влияние чесночного сока на меристемные корни *Allium cepa* L.

The Influence of Alliaceous Juice on Meristematic Cells of the Roots of *Allium cepa* L.

Działanie antybiotyczne substancji roślinnych jest od dawna znane (3,18). Powodują one zaburzenia w przemianach metabolicznych (16), hamują wzrost, a nawet wywoływać mogą śmierć organizmów. Silnym działaniem antybiotycznym odznaczają się lotne i płynne substancje zawarte w cebulkach czosnku pospolitego (5,7).

Rodkiewicz (13) przebadał między innymi wpływ czosnku na plazmodia służowców i komórki korzeni *Allium cepa* L. i stwierdził w tych ostatnich zaburzenia w kariokinezach oraz rozpraszanie się chromatyny jądrowej w cytoplazmie. Z nielicznych badań biochemicznych zwracają uwagę obserwacje Szymony (17), który uważa, że zmiany w komórkach spowodowane są zablokowaniem czynności niektórych enzymów oddechowych.

W badaniach naszych przeanalizowano wpływ soku czosnkowego „Alliostabil“ (Herbapol) na komórki merystematyczne *Allium cepa* L. dokonując obserwacji w mikroskopie świetlnym i elektronowym.

MATERIAŁ I METODY

Cebule z wyrośniętymi w wodzie zwykłej korzeniami długości 1–4 cm umieszczano w naczyniach z sokiem czosnkowym „Alliostabil“ na okres 0,5 i 1,0 godziny. Cebule stanowiące grupę kontrolną pozostawiano w wodzie. Następnie odcinano wierzchołkowe części korzeni długości 2 mm. Uzyskany materiał utrwalało w alkoholu octowym (3 : 1) i zatapiano w parafinie. Skrawki podłużne grubości 10 μ barwiono hematoksyliną i eoźną oraz odczynnikiem Schiffa według Feulgena.

Materiał do badań w mikroskopie elektronowym utrwalało w 6% aldehydzie glutarowym zbuforowanym do pH 7,2 buforem Palada przez 2 godziny w temp. 0°–4°C, a następnie po przepłukaniu w czystym buforze dotrwalało w 2% roztworze OsO₄ w buforze Palada o tym samym pH przez 2 godziny w temp. 0°–4°C. Po utrwaleniu materiał odwadniano w szeregu alkoholowym o wzrastającym stężeniu od 30% do 100%. Zatapiano w mieszaninie metakrylanów metylu i n-bu-

tylu w stosunku 1 : 3,5. Polimeryzowano w temp. 48°C przez 24 godziny. Cienkie skrawki sporządzano na ultramikrotomie Tesla BS 490, oglądano i fotografowano w mikroskopach: Elmi D-2 Zeiss (NRD) i Tesla BS 613 (CSR).

BADANIA WŁASNE

Obserwacje nad zmianami zachodzącymi pod wpływem pół i jedno godzinnego działania soku czosnkowego na komórki merystematyczne korzeni cebuli prowadzono pod kątem: a) zmian w obrazie struktur komórkowych i b) w przebiegu podziałów komórkowych.

Komórki merystematyczne korzeni *Allium cepa* L., kontrolne, otoczone były wyraźną ścianą komórkową (ryc. 11). Jądra, na przekrojach okrągłe lub owalne, zajmujące stosunkowo dużą część komórki, posiadały dwuwarstwową błonę. Przestrzeń zawarta pomiędzy warstwami błony jądrowej wykazywała łączność z retikulum endoplazmatycznym (ryc. 10). Nukleoplazma zawierała ziarnisty materiał o małej gęstości elektronowej (ryc. 10). W jądrze znajdowało się jedno lub więcej jąderek. Retikulum endoplazmatyczne było stosunkowo słabo wykształcone (ryc. 11, 12). Wolno leżące, liczne rybosomy wypełniały cytoplazmę komórki. Dictyosomy występowały zwykle grupami i utworzone były z cystern, którym towarzyszyły różnej wielkości pęcherzyki (ryc. 11). W obrębie cytoplazmy obserwowano liczne, różnych kształtów od okrągłego do ameboidalnego i różnej wielkości mitochondria (ryc. 10, 12). Posiadały one wyraźną dwuwarstwową otoczkę. Liczne stosunkowo grzebień mitochondrialne miały kształt nieregularnych pęcherzyków (ryc. 10). W substancji macierzystej mitochondriów znajdowały się gęste elektronowo ziarenka (ryc. 12). Do innych organelli występujących w cytoplazmie należały struktury różniące się od opisanych mitochondriów gęstością elektronową, nie posiadające tworów podobnych do grzebieni, które identyfikowano jako proplastydy.

Pod wpływem półgodzinnego działania soku czosnkowego następowało wyraźne obkurczanie się protoplastów przy zachowaniu nienaruszonej ściany komórkowej (ryc. 13). Cytoplazma przyjmowała postać skupionych, gęstych elektronowo ziaren. W komórkach pojawiały się duże, elektronowo jasne przestrzenie i zanikały wszystkie organelle komórkowe. Obrisy jąder ulegały nieznacznym odkształceniom (ryc. 14), a ich błona była w wielu miejscach porozrywana (ryc. 13, 14). Chromatyna jądrowa występowała w postaci zbitych, gęstych elektronowo skupień (ryc. 13, 15). Gęste elektronowo jąderka miały wygląd bezstrukturalny (ryc. 13).

Po jednej godzinie działania soku czosnkowego pogłębiały się zmiany destrukcyjne w komórkach. Obserwowano głównie uszkodzenie ścian komórkowych, które były poprzerywane w wielu miejscach (ryc. 16, 17). Pozostałości cytoplazmy tworzyły wysepki ziarnistego materiału, z widocznymi w nich wakuolami różnej wielkości (ryc. 16, 17, 18). Cienka, jednowarstwowa otoczką błony jądrowej nie zachowywała ciągłości. Była ona porozrywana, co umożliwiało „rozwlekanie” chromatyny jądrowej, której nieliczne skupienia widoczne były na terenie jądra (ryc. 16, 17), pozostała ich część w cytoplazmie.

Podobne zjawisko „rozwlekania” chromatyny jądrowej obserwowano w preparatach barwionych hematoksyliną i eozyną, a przede wszystkim odczynnikiem Schiffa. Jądra interfazowe po pół i jednogodzinnym działaniu soku czosnkowego zachowywały ziarnistą strukturę, przy czym obok nich widoczne były grudki różnej wielkości dające podobnie jak jądra dodatni odczyn Feulgena (ryc. 1). Obraz ten wskazywał na możliwość przechodzenia chromatyny jądrowej poza obręb jądra do cytoplazmy, w następstwie uszkodzenia błony jądrowej. Zmiany obserwowane w jądrach interfazowych pod wpływem soku czosnkowego mogły niewątpliwie rzutować na przebieg podziału komórki, a przede wszystkim na podział jądra.

Najwyraźniejsze zmiany dało się zauważyć w anafazie, gdyż w tym stadium już po półgodzinnym działaniu czosnku obserwowano zaburzenia w wędrówce chromosomów do biegunów. Stosunkowo licznie jeszcze występujące anafazy charakteryzowało opóźnienie w rozchodzeniu się chromosomów (ryc. 2). W stadiach tych obserwowano często i takie przypadki, gdzie chromosomy końcami swych ramion, a nie centromerami zwrócone były w stronę biegunów (ryc. 3). Zwracała również uwagę obecność mostów łączących obie rozchodzące się grupy chromosomów (ryc. 4). Po jednogodzinnym działaniu czosnku, anafazy były nieliczne, a przebieg ich charakteryzowała różnoczasowość w przesuwaniu się chromosomów ku biegunom (ryc. 5, 6). Niekiedy można też było zauważyć anafazy, w których zaznaczał się rozdział chromosomów na trzy grupy. Obrazy tego typu zdawały się świadczyć o pewnym ukształtowaniu wrzeciona kariokinetycznego.

W jądrach telofazowych widoczne były również zmiany spowodowane działaniem soku czosnkowego. Opóźniająca się anafaza powodowała odmienne od kontrolnych obrazy jąder telofazowych (ryc. 7, 8 i 9). Jądra te posiadały owalne, ale nieregularne kształty oraz barwiły się prawie homogenicznie. Obok nich widoczne były różnej wielkości grudki chromatynowe zachowujące połączenie z jądrem. Grudki te powstały prawdopodobnie z opóźniających się w anafazie chromosomów, które nie weszły w skład jądra telofazowego. Mosty obserwowano w telofazie rzadko. Często natomiast po rozejściu się obu grup chromosomów i utworzeniu jąder telofazowych nie można było dostrzec blaszki środkowej, co świadczyłoby o zahamowaniu cytokinezy.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Badania Jeżowej i wsp. (7) zwróciły uwagę na bakteriobójczą aktywność cebulek czosnku pospolitego (*Allium sativum* L.), natomiast biochemiczna analiza przeprowadzona przez Stolla i Seebecka (15) wykazała, że głównym składnikiem wyizolowanym ze świeżych cebulek jest aminokwas aliina, rozkładający się pod wpływem aliinazy na alicynę, kwas pirogronowy i amoniak. Cavallito i Bailey (1) otrzymywali z surowca alicynę i stwierdzili, że to właśnie ona ma właściwości bakteriobójcze. Farmakodynamiczne działanie cebulek czosnku pozwoliło na opracowanie nowoczesnych form leku, jak również metod oznaczania ciał czynnych w surowcu (2, 6, 7, 8, 10, 11, 12).

Zagadnieniem wpływu różnych stężeń soku czosnkowego i lotnych substancji czosnku na komórki roślinne zajmował się Rodkiewicz (13), który stwierdził, że po 6 i 12 godzinach daje się zauważyć obkurczanie cytoplazmy, a przede wszystkim zmiany w przebiegu podziałów komórkowych. Obserwowane przez nas, zarówno w mikroskopie optycznym jak i elektronowym, obkurczanie się cytoplazmy związane z oddzielaniem się błony plazmatycznej od ściany komórkowej jest — jak się wydaje — uwarunkowane zmianą w przepuszczalności błony plazmatycznej pod wpływem Allio-stabilu. Pierwszą bowiem reakcją komórki na patogenny czynnik jest według Wheelera i Luke (20) właśnie zmiana przepuszczalności błony.

Nasze elektronomikroskopowe obserwacje wykazały, że działanie destrukcyjne na cytoplazmę rozpoczynało się prawie natychmiast po zetknięciu się komórki roślinnej z sokiem czosnkowym. Półgodzinny wpływ Allio-stabilu prowadził do niszczenia wewnętrznego systemu błon cytoplazmatycznych oraz do zaniku obłonionych struktur w tym mitochondriów i proplastydów. Dłuższe działanie soku czosnkowego powodowało również rozpad ściany komórkowej. Podobne zmiany w obrębie ściany komórkowej łącznie z obrzmieniem i rozerwaniem otoczki zewnętrznej mitochondriów w komórkach korzeni owsa, ale pod wpływem patotoksyny otrzymanej z *Helminthosporium victoriae* (victorin), opisywali Hanckey i wsp. (4). Według tych autorów zmiany w przepuszczalności błony powodowane przez victorin prowadzą do aktywacji enzymów rozkładających ścianę komórkową. Sato (14) działając na komórkę roślinną iperytem azotowym (nitrogen mustard) obserwował pęcherzykowatość cytoplazmy i uszkodzenie mitochondriów. Lettré (9) podkreślił, że związek ten atakuje najpierw mitochondria, a dopiero w następnej kolejności jądra komórkowe. Z biochemicznych badań Szymony (17) wynika, że fitoncydy czosnku blokują czynność enzymów oddechowych.

W świetle badań Lettré (9) i Szymony (17) stwierdzony przez nas na elektronomikrografach brak mitochondriów jest prawdopodobnie spowodowany najpierw zmianami przepuszczalności błon mitochondrialnych, a następnie aktywacją enzymów rozkładających błony plazmatyczne i ścianę komórkową. Allio-stabil prowadzi zatem do zmian cytolitycznych w komórce, a niszcząc błony mitochondrialne inaktywuje enzymy oddechowe.

Allio-stabil powodował również zaburzenia w przebiegu podziałów mitotycznych. Przejawiały się one rozwlekaniem chromatyny jądrowej w obrębie cytoplazmy oraz uszkodzeniem wrzeciona kariokinetycznego, które wyrażało się niejednocześnie w przemieszczaniu i nierównomiernością w rozmieszczeniu chromosomów, szczególnie w anafazie i telofazie oraz tworzeniem się mostów łączących dwie gwiazdy potomne. Nasze przypuszczenia o uszkodzeniu wrzeciona kariokinetycznego znajdują oparcie w badaniach Wajdy (19) i Sato (14), którzy otrzymali obrazy podobne, ale po zadziałaniu parami jodu, kolchicyną i merkaptoetanolom. Można więc na tej podstawie zaliczyć Allio-stabil do substancji antymitotycznych porażających wrzeciono.

PIŚMIENNICTWO

1. Cavallito C. J., Bailey J. H.: J. Amer. Chem. Soc. **66**, 1950, 1944.
2. Gaiind K.N., Dar R. N., Popli S. D.: Indian J. Pharm. **27**, 199, 1965.
3. Gammerman A. F., Epsztejn M. M., Szamraj E. F.: Fitoncidy w medycynie. Izd. Akad. Nauk Ukr. SSR. **5**, Kijew 1959.
4. Hanckey P., Wheeler H., Luke H. H.: Amer. J. Bot. **55**, 53—61, 1968.
5. Hörhammer L., Wagner H., Seitz M., Vejdelek Z. J.: Die Pharmazie. **23**, 462, 1968
6. Jäger H.: Arch. Pharm. **288**, 145, 1955.
7. Jeżowa L., Rafiński T., Wrociński T.: Herba Pol. **12**, 3—13, 1966.
8. Kędzia W., Lutomski J., Muszyński Z., Kędzia B.: Herba Pol. **15**, 222, 1969.
9. Lettré H.: Am. N. Y. Acad. Sci. **58**, 1264, 1954.
10. Lutomski J., Adamczewski B., Ostrowska B., Farm. Pol. **24**, 575—580, 1968.
11. Lutomski J., Kędzia W., Adamczewski B., Muszyński Z.: Farm. Pol. **25**, 995—998 1969.
12. Lutomski J., Kędzia B., Adamczewski B., Kędzia W.: Herba Pol. **15**, 363—368, 1969.
13. Rodkiewicz B.: Acta Soc. Bot. Pol. **23**, 1—10, 1954.
14. Sato S.: Cytologia (Japan). **37**, 415—422, 1970.
15. Stoll A., Seebeck E.: Helv. Chim. Acta. **31**, 189, 1948.
16. Ślopek S.: Mikrobiologia lekarska. s. 336. PZWL Warszawa 1958.
17. Szymona M.: Acta Microbiol. Pol. **1**, 5—23, 1952.
18. Tokin B. P.: Fitoncidy w medycynie. Izd. Akad. Nauk SSR. Kijew 1959.
19. Wajda L.: Acta Soc. Bot. Pol. **32**, 553—574, 1963.
20. Wheeler H., Luke H.: Ann. Rev. Microbiol. **17**, 223—242, 1963.

Otrzymano 15.XII.1970.

OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1. *Allium cepa* L. Jądro interfazowe. Allio stabil (0,5 godz.). Feulgen. Pow. ok. 2300 ×.

Ryc. 2, 3, 4, *Allium cepa* L. Anafaza. Allio stabil (0,5 godz.). Feulgen. Pow. ok. 2300 ×.

Ryc. 5, 6, *Allium cepa* L. Anafaza. Allio stabil (1 godz.). Feulgen. Pow. ok. 2300 ×.

Ryc. 7. *Allium cepa* L. Telofaza. Allio stabil (0,5 godz.). Feulgen. Pow. ok. 2300 ×.

Ryc. 8, 9. *Allium cepa* L. Późna telofaza. Allio stabil (1 godz.). Feulgen. Pow. ok. 2300 ×.

Ryc. 10. Komórka merystematyczna korzenia *Allium cepa* L. Kontrola. Mikr. elektr. Tesla BS 613 (CSRS). Pow. 58000 ×. ER-reticulum endoplazmatyczne, R-rybosomy, M-mitochondria, N-jądro.

Ryc. 11. Komórka merystematyczna korzenia *Allium cepa* L. Kontrola. Mikr. elektr. Tesla BS 613 (CSRS). Pow. 35000 ×. ER-reticulum endoplazmatyczne, R-rybosomy, D-dictyosomy, CW-ściana komórkowa.

Ryc. 12. Komórka merystematyczna korzenia *Allium cepa* L. Kontrola. Mikr. elektr. Tesla BS 613 (CSRS). Pow. 81000 ×. ER-reticulum endoplazmatyczne, R-rybosomy, PP-proplastydy,

Ryc. 13. Komórka merystematyczna korzenia *Allium cepa* L. Allio stabil (0,5 godz.). Mikr. elektr. Tesla BS 613 (CSRS). Pow. 17500 ×. CW-ściana komórkowa, N-jądro, Nu-jąderko, CM-błona plazmatyczna.

Ryc. 14. Komórka merystematyczna korzenia *Allium cepa* L. Allio stabil (0,5 godz.). Mikr. elektr. Tesla BS 613 (CSRS). Pow. 14000 ×. CW-ściana komórkowa, N-jądro.

Ryc. 15. Komórka merystematyczna korzenia *Allium cepa* L. Allio stabil (0,5 godz.). Mikr. elektr. Tesla BS 613 (CSRS). Pow. 18500 ×. CW-ściana komórkowa, N-jądro.

Рис. 16. Komórki merystematyczne korzenia *Allium cepa* L. Alliostabil (1 godz.). Mikr. elektr. Elmi D-2 Zeiss (NRD). Pow. 8700 ×. CW-ściana komórkowa, N-jądro.

Рис. 17. Komórki merystematyczne korzenia *Allium cepa* L. Alliostabil (1 godz.). Mikr. elektr. Tesla BS 613 (CSRS). Pow. 25000 ×. CW-ściana komórkowa, N-jądro.

Рис. 18. Komórki merystematyczne korzenia *Allium cepa* L. Alliostabil (1 godz.). Mikr. elektr. Tesla BS 613 (CSRS) Pow. 25000 ×. CW-ściana komórkowa, N-jądro.

РЕЗЮМЕ

Проанализировали влияние чесночного сока „Alliostabil” (Herbapol) на меристемные клетки корней *Allium cepa* L. Наблюдения проводились при помощи светового и электронного микроскопов. Констатировали, что после 30-минутного действия чесночного сока Alliostabil выступило сжатие и вакуолизация цитоплазмы, а также исчезновение митохондрий и пропластидов, зато после 1 часа было видно нарушение клеточных стенок и ядерной оболочки, в результате чего ядерный хроматин попадал в цитоплазму.

Alliostabil вызывал также нарушение в ходе митотических делений, которое заметно в основном в стадиях анафазы и телофазы. Наблюдали анафазы с опаздывающими, при миграции к полюсу, хромосомами, мосты, соединяющие две группы расходящихся хромосомов, а также неравномерное размещение хромосомов на полюсах. Телофазовые ядра имели нерегулярные очертания, а часть хроматина в форме гранул разной величины оставалась вне ядер.

SUMMARY

The influence of alliaceous juice „Alliostabil” (Herbapol) on meristematic cells of the roots of *Allium cepa* L. was examined. The observations were made under an electron and light microscope. It was found that after a half hour action of Alliostabil there occurred the shrinkage and vacuolization of cytoplasm, and disappearance of mitochondria and proplastids. After an hour, on the other hand, there was observed the injury of cellular walls and nuclear membrane, and, as a result, the nuclear chromatin penetrated into the cytoplasm.

Alliostabil also caused disturbances in the course of mitotic division, which were visible mainly in the stage of anaphase and telophase. There were observed the anaphases with chromosomes retarded on their way towards the poles, bridges linking the two groups of separated chromosomes, as well as uneven distribution of the chromosomes on the poles. The telophase nuclei were of irregular outlines and part of the chromatin in the form of clods of various sizes remained outside the nuclei.

EXPLANATION OF FIGURES

- Fig. 1. *Allium cepa* L. Interphase nucleus. Alliostabil (1/2 hr). Feulgen. Magn. ca 2300 ×
 Fig. 2, 3, 4. *Allium cepa* L. Anaphase. Alliostabil (1/2 hr). Feulgen. Magn. ca 2300 ×
 Fig. 5, 6. *Allium cepa* L. Anaphase. Alliostabil (1 hr). Feulgen. Magn. ca 2300 ×

Fig. 7. *Allium cepa* L. Telophase. Allio stabil (1/2 hr). Feulgen. Magn. ca 2300 ×

Fig. 8, 9. *Allium cepa* L. Late telophase. Allio stabil (1 hr). Feulgen. Magn. ca 2300 ×

Fig. 10. A meristematic cell of the *Allium cepa* L. root. Control. Electron microscope Tesla BS 613 (CSRS). Magn. 58,000 ×. ER — endoplasmic reticulum, R — ribosomes, M — mitochondria, N — nucleus

Fig. 11. A meristematic cell of the *Allium cepa* L. root. Control. Electron microscope Tesla BS 613 (CSRS). Magn. 35,000 ×. ER — endoplasmic reticulum, R — ribosomes, D — dictyosomes, CW — cellular wall

Fig. 12. A meristematic cell of the *Allium cepa* L. root. Control. Electron microscope Tesla BS 613 (CSRS). Magn. 81,000 ×. ER — endoplasmic reticulum, R — ribosomes, PP — proplastids

Fig. 13. A meristematic cell of the *Allium cepa* L. root. Allio stabil (1/2 hr). Electron microscope Tesla BS 613 (CSRS). Magn. 17,500 ×. CW — cellular wall, N — nucleus, Nu — nucleolus, CM — plasmic membrane

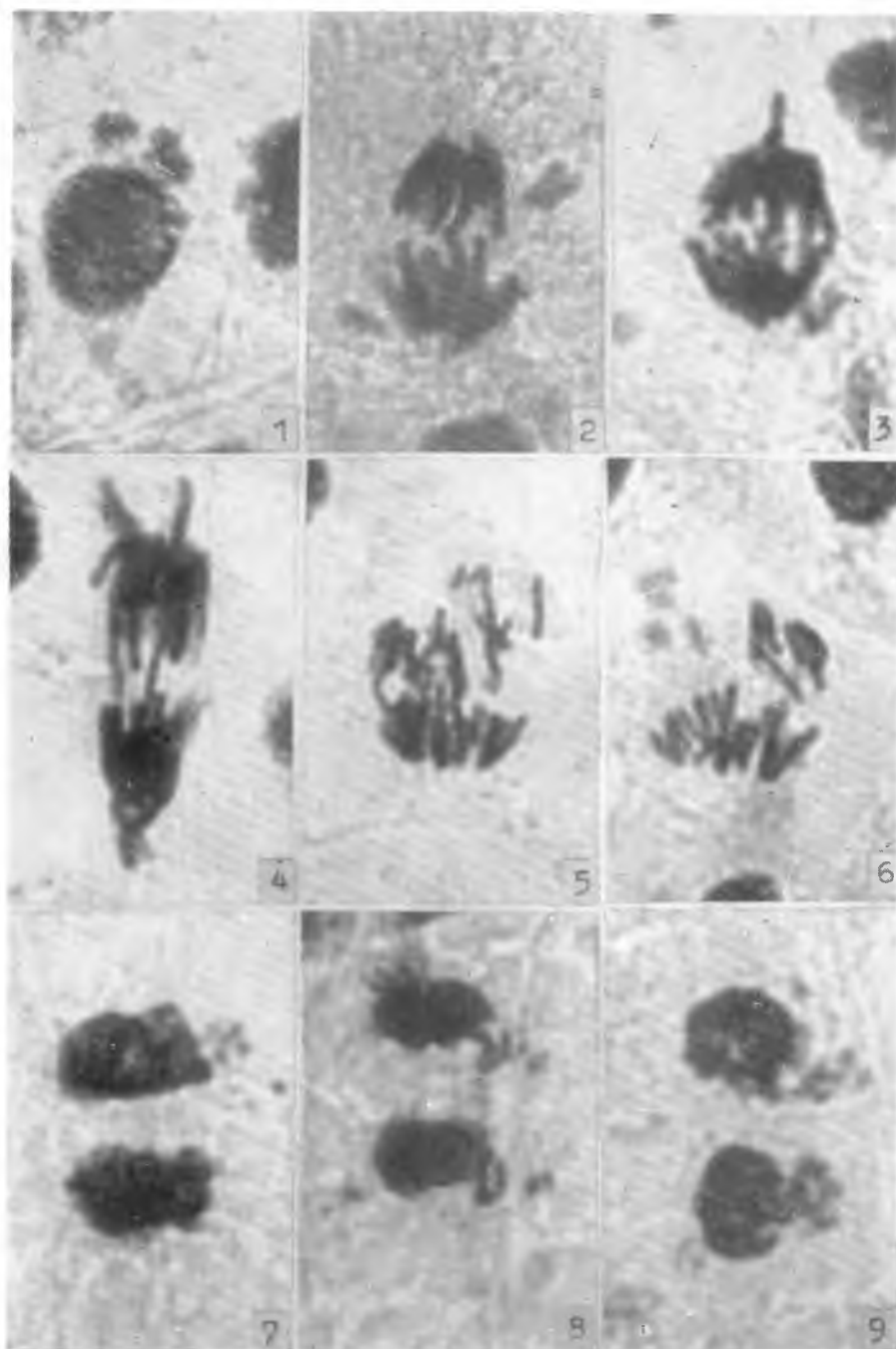
Fig. 14. A meristematic cell of the *Allium cepa* L. root. Allio stabil (1/2 hr). Electron microscope Tesla BS 613 (CSRS). Magn. 14,000 ×. CW — cellular wall, N — nucleus

Fig. 15. A meristematic cell of the *Allium cepa* L. root. Allio stabil (1/2 hr). Electron microscope Tesla BS 613 (CSRS). Magn. 18,500 ×. CW — cellular wall, N — nucleus

Fig. 16. Meristematic cells of the *Allium cepa* L. root. Allio stabil (1 hr). Electron microscope Elmi D-2 Zeiss (East Germany). Magn. 8700 ×. CW — cellular wall, N — nucleus

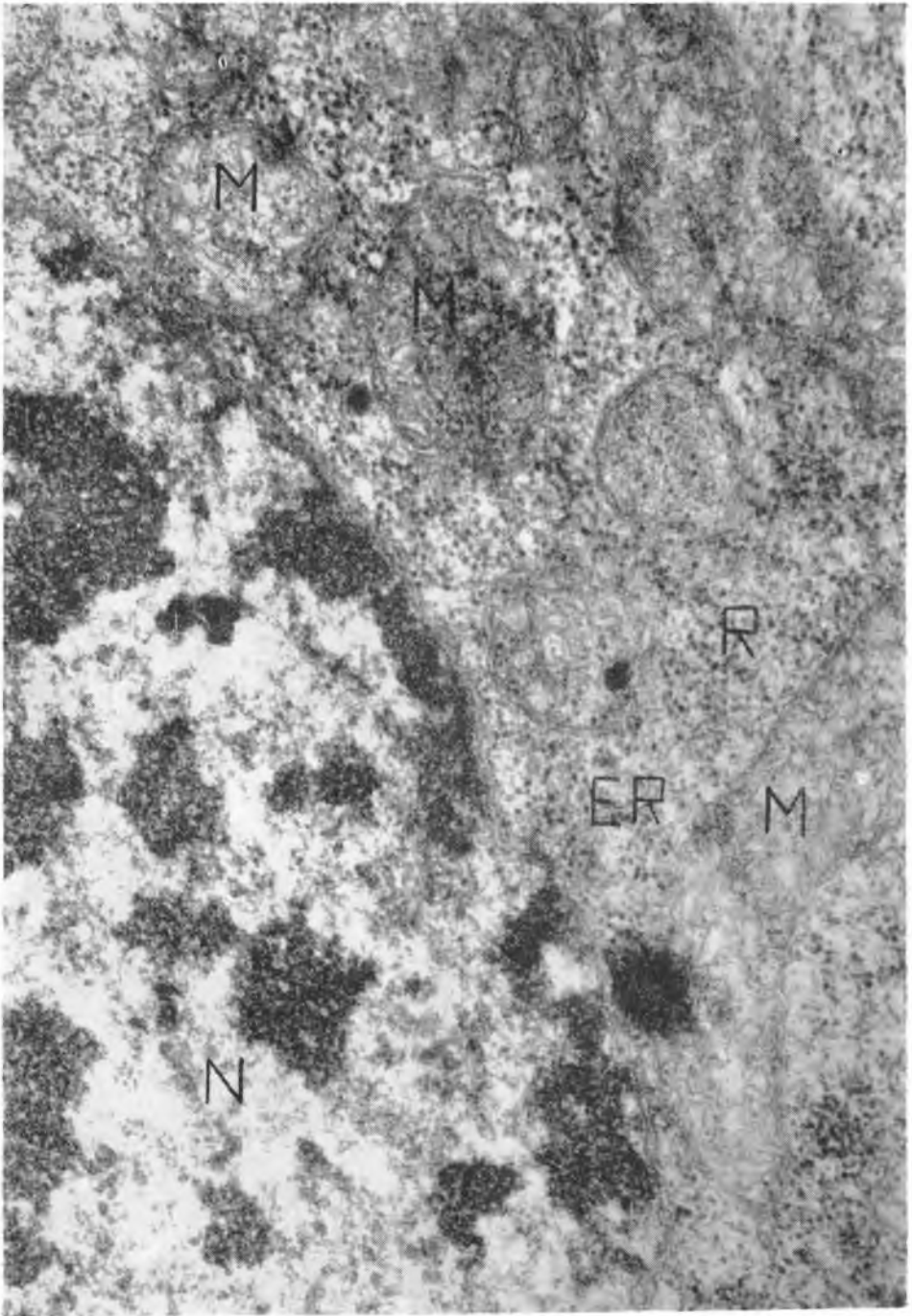
Fig. 17. Meristematic cells of the *Allium cepa* L. root. Allio stabil (1 hr). Electron microscope Tesla BS 613 (CSRS). Magn. 25,000 ×. CW — cellular wall, N — nucleus

Fig. 18. Meristematic cells of the *Allium cepa* L. root. Allio stabil (1 hr). Electron microscope Tesla BS 613 (CSRS). Magn. 25,000 ×. CW — cellular wall, N — nucleus



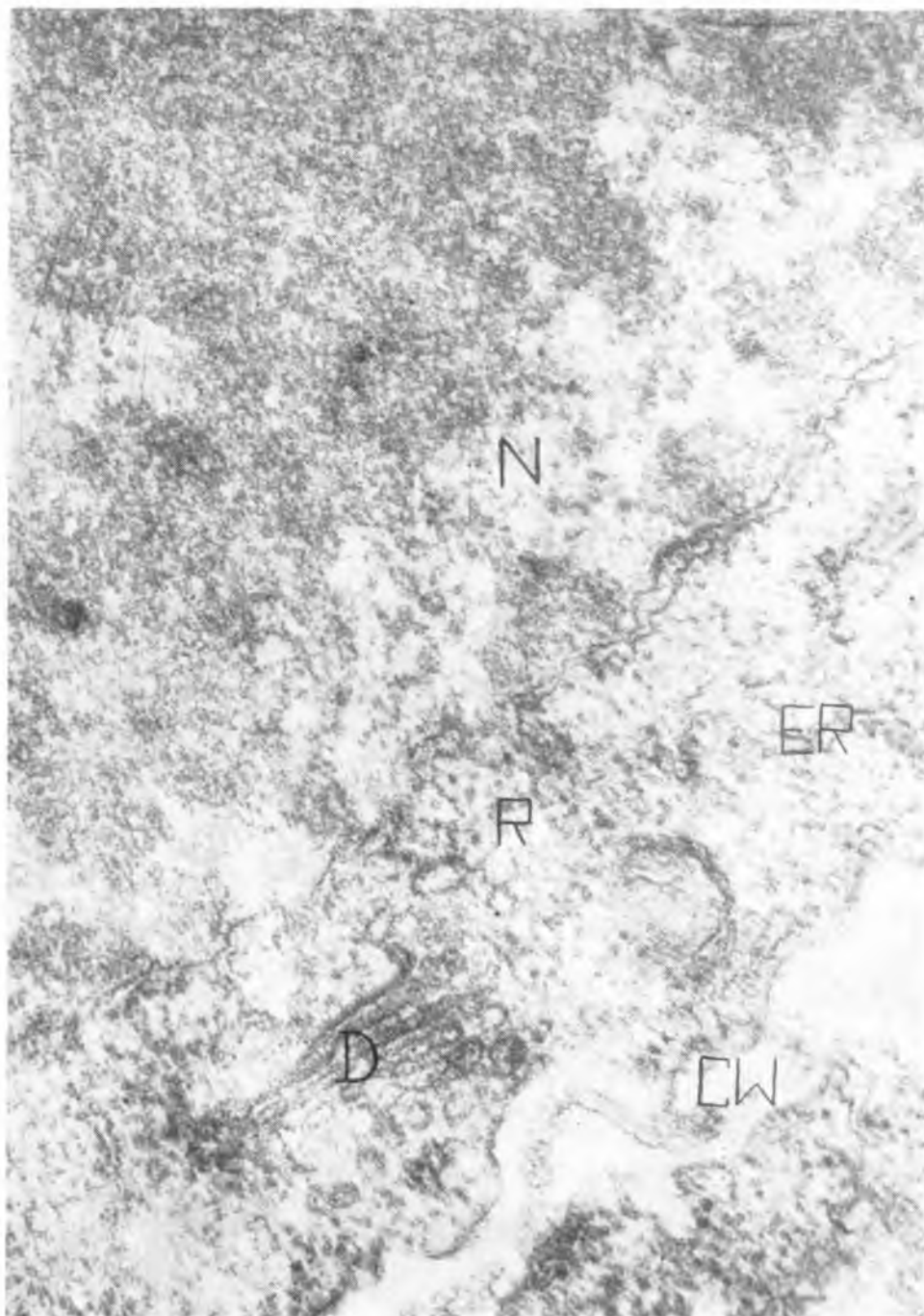
Ryc. 1-9

Kazimiera Grzycka, Daniela Obuchowska



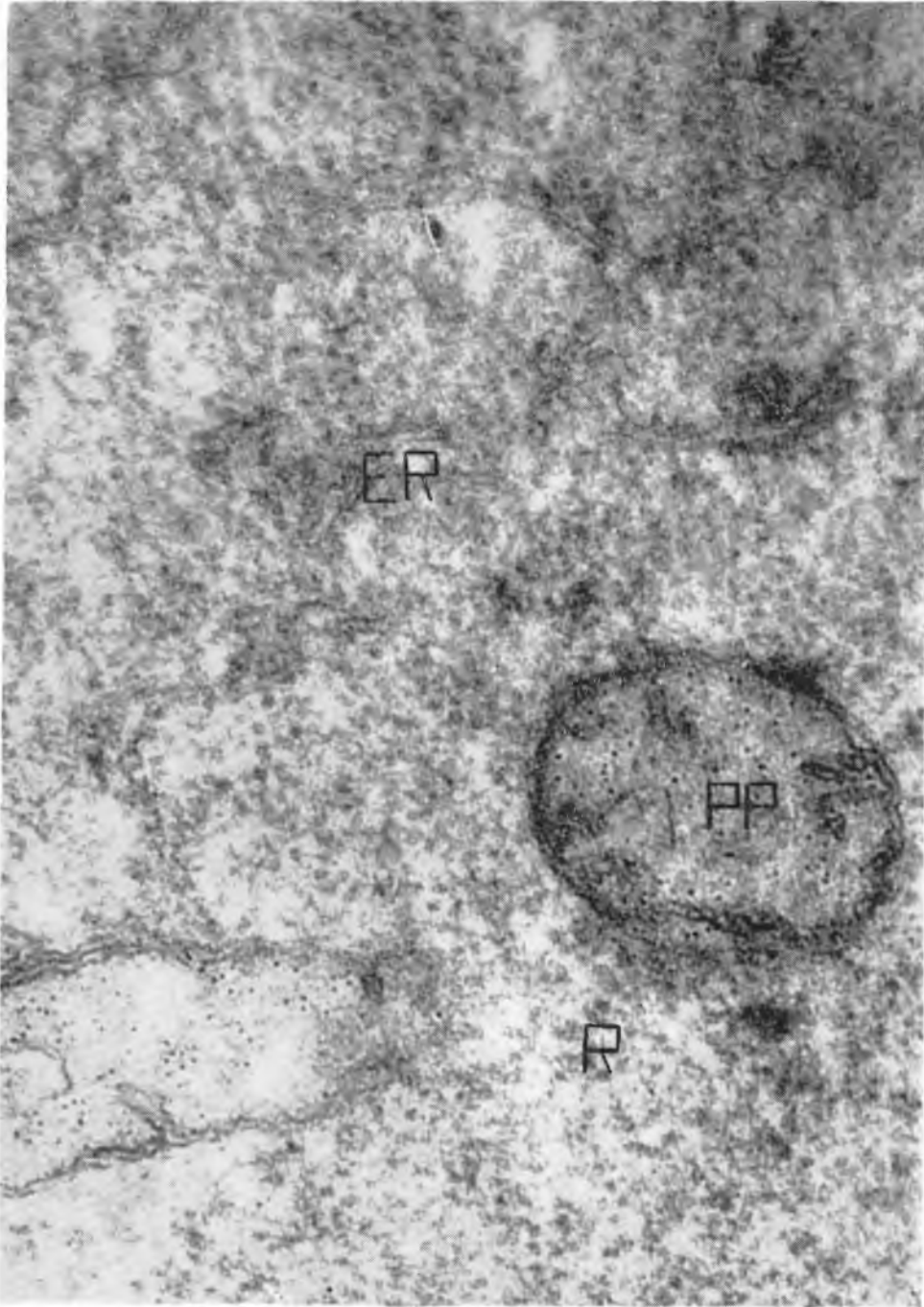
Ryc. 10

Kazimiera Grzycka, Daniela Obuchowska



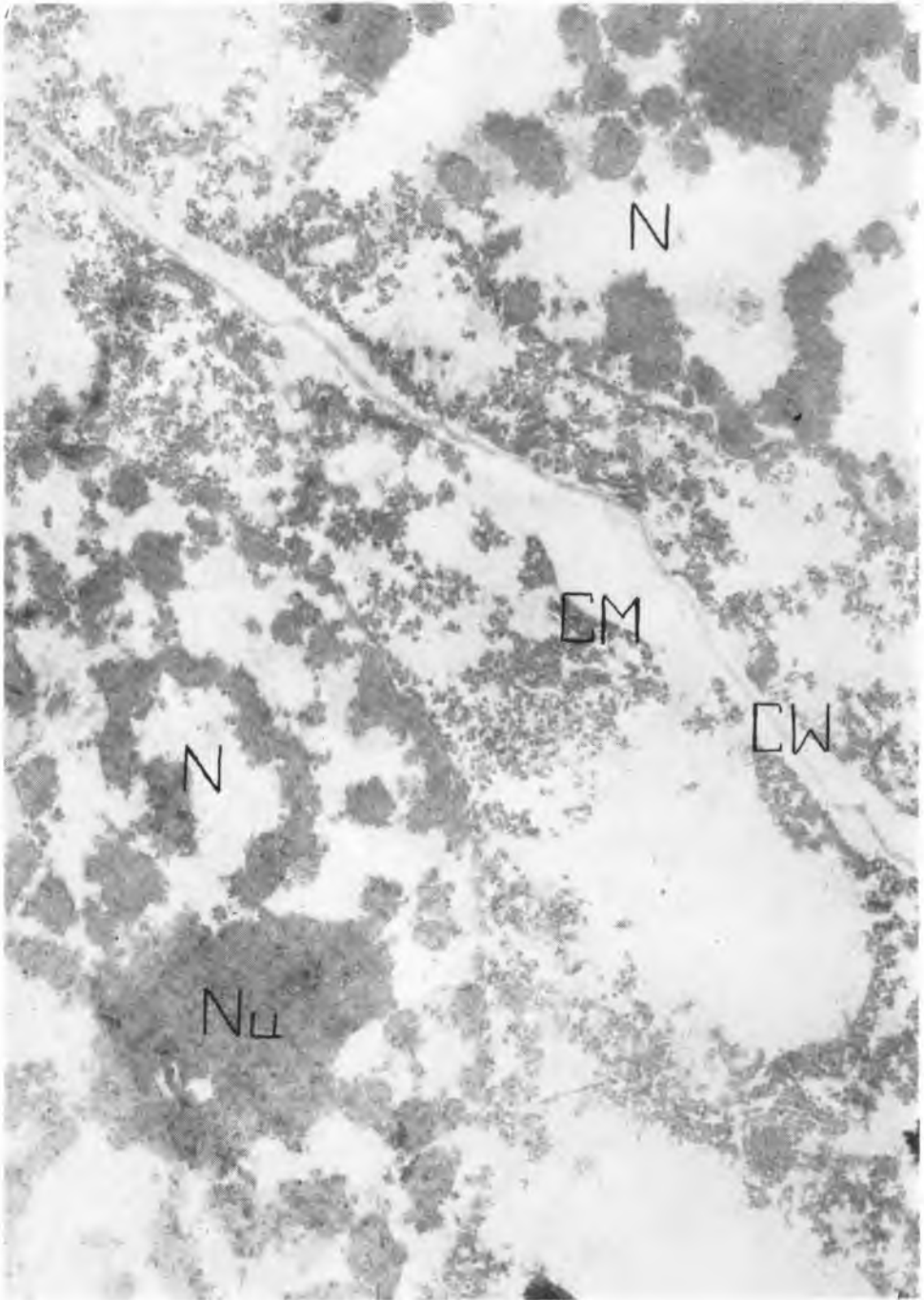
Ryc. 11

Kazimiera Grzycka, Daniela Obuchowska



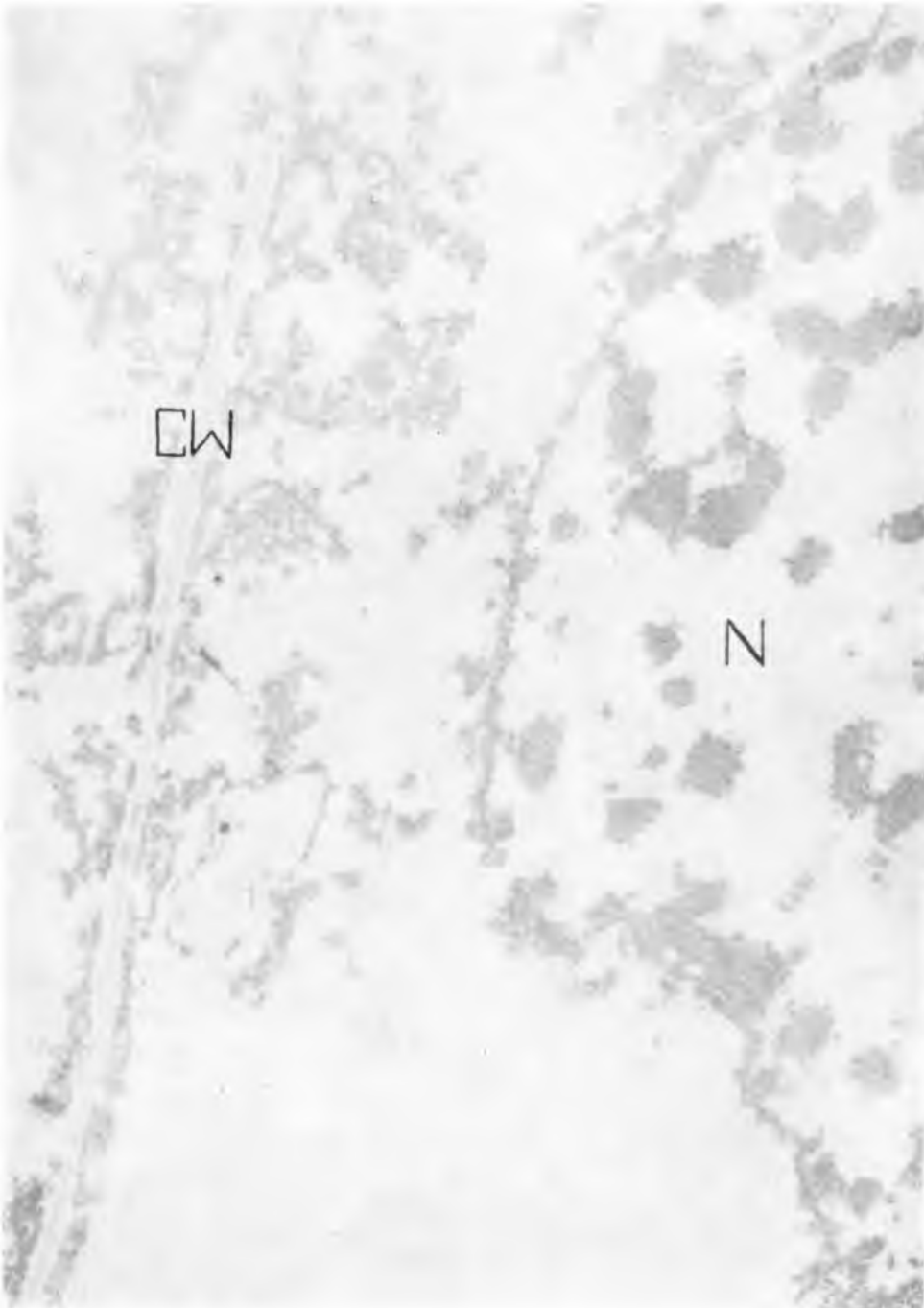
Ryc. 12

Kazimiera Grzycka, Daniela Obuchowska



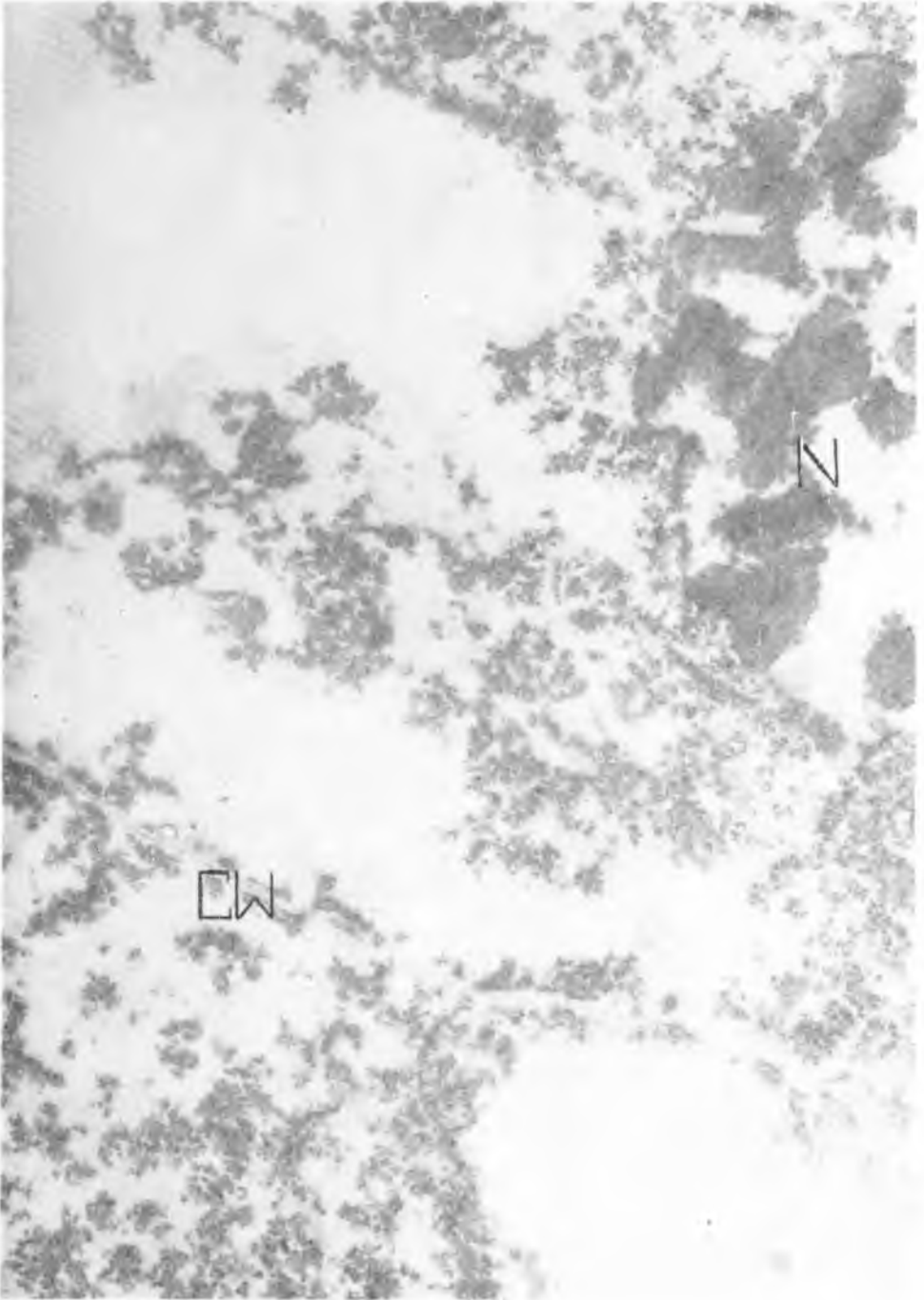
Ryc. 13

Kazimiera Grzycka, Daniela Obuchowska



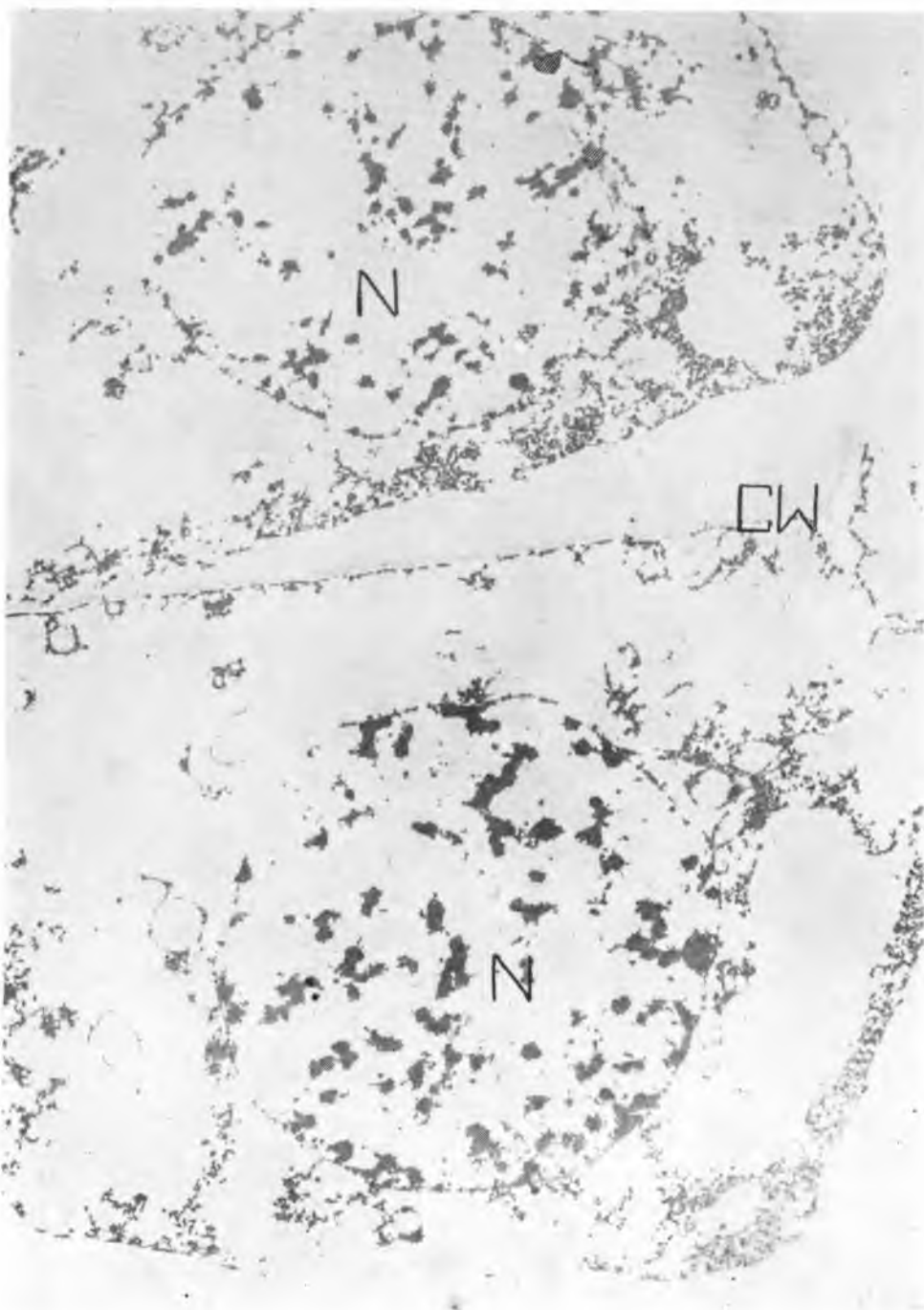
Ryc. 14

Kazimiera Grzycka, Daniela Obuchowska



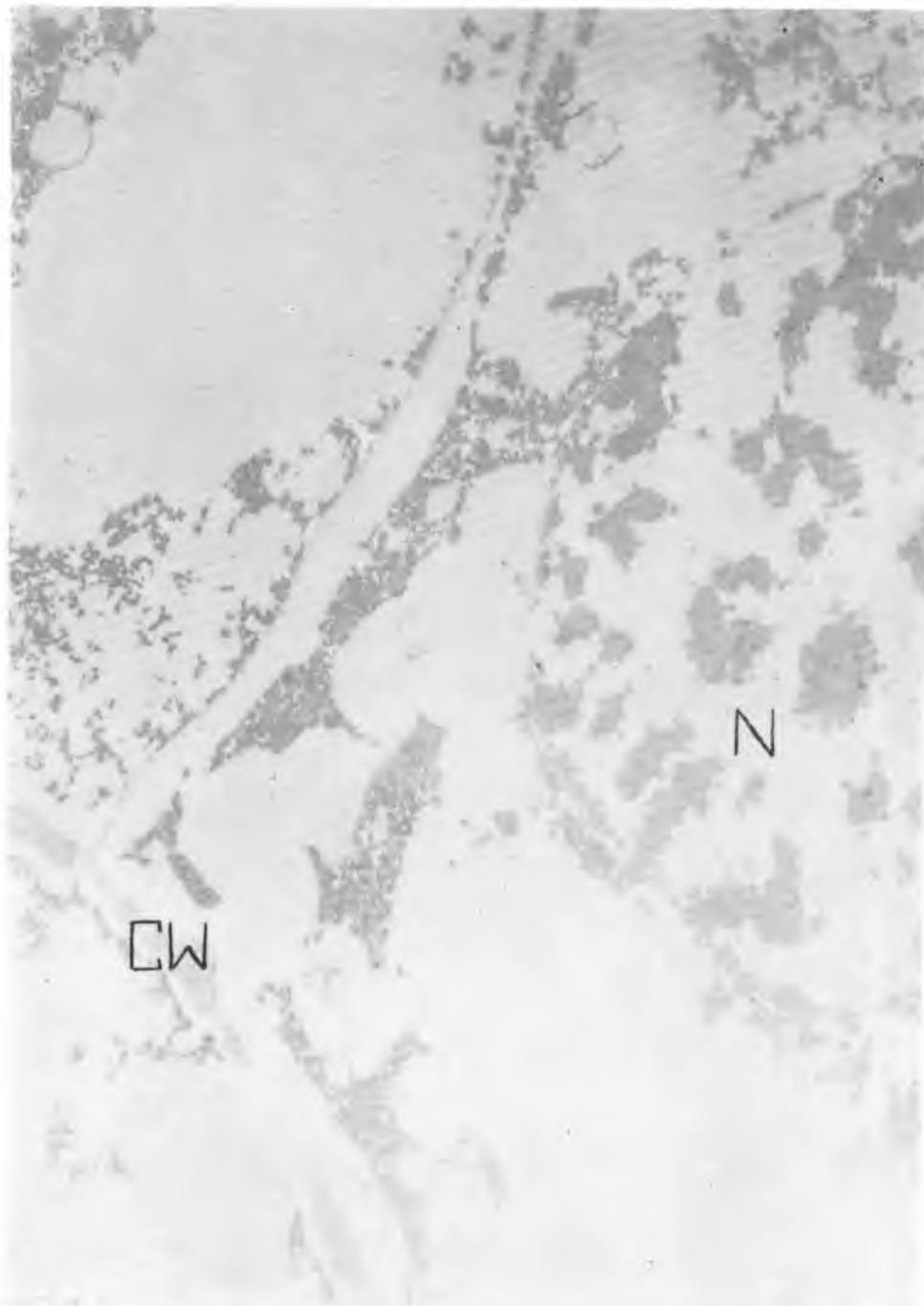
Ryc. 15

Kazimiera Grzycka, Daniela Obuchowska



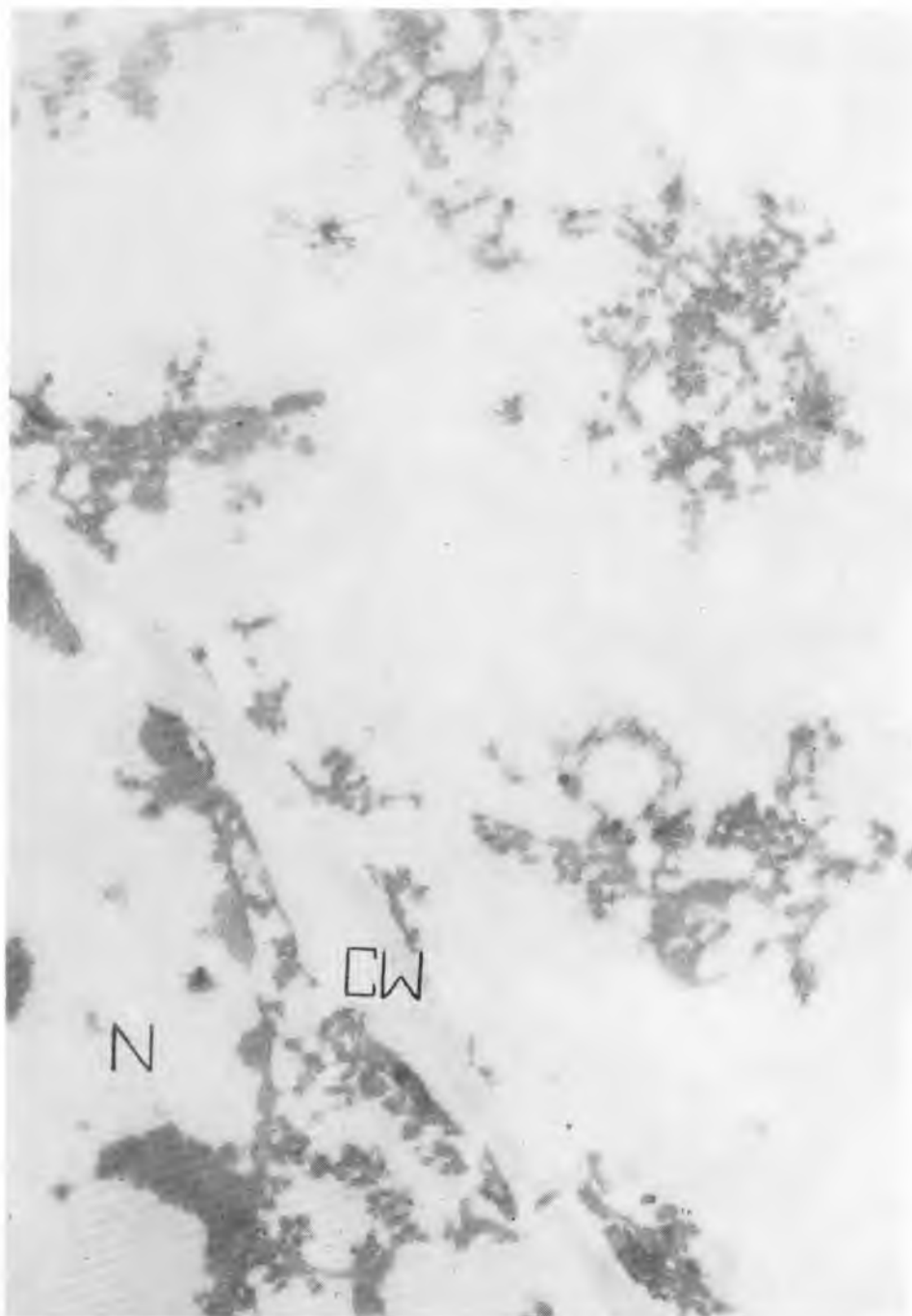
Rys. 16

Kazimiera Grzycka, Daniela Obuchowska



Ryc. 17

Kazimiera Grzycka, Daniela Obuchowska



Ryc. 18

Kazimiera Grzycka, Daniela Obuchowska