

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

Jadwiga MIŁKOWSKA

**Badania nad zawartością białkowych grup SH w merystematycznych komórkach korzeni kukurydzy (*Zea mays* L.) rozwijających się w różnych temperaturach otoczenia**

**Исследования над содержанием белковых групп SH в меристематических клетках корня кукурузы (*Zea mays* L.) развивающихся в разных температурах среды**

**An Investigation into the Content of Protein-Bound SH Groups in Meristematic Cells of *Zea mays* L. Grown at Different Environmental Temperatures**

Zagadnieniem występowania i rolą grup sulfhydrylowych i disulfidowych w komórkach roślinnych zajmowali się Anson i Stanley (1941), Roberts (1951, 1956, 1960), Roberts i Lucchese (1955), Torey (1953), Stern (1956), Brachet (1956), Miłkowska (1961, 1962) i inni. Roberts posługując się w badaniach histochemicznych odczynnikiem 4-jodoacetamido-1-naftolem (IAN) obserwował najwyższe stężenie białkowych grup związanych z SH w promerystemie zarodka korzenia *Zea mays* L. i zmniejszanie się zawartości tych grup w miarę oddalania się od wierzchołka. W innej pracy (1960) Roberts przeprowadził badania nad zmianami stężenia SH w czasie podziału komórki na zranionym merystemie łodygi *Coleus blumei* Benth. Posługiwał się przy tym metodą Bennetta używając odczynnika 1-(4-chlorortęciofeniloazo) naftolu-2 (Mercury Orange), a także metodą Barnetta i Seligmana z zastosowaniem odczynnika dwusiarczku 2,2-dwuhydroksy-6,6 dwunaftyłowego (DDD). W wyniku przeprowadzonych badań Roberts doszedł do wniosku, że nie istnieją wyraźne różnice w stężeniu grup SH przed podziałem i bezpośrednio po podziałach komórek, natomiast w okolicach podziału w obrębie

zranionego merystemu odczyn histochemiczny był wyraźny. Roberts i Lucchese (1955) zastosowali metodę Joyet-Lavergne z nitroprusydkiem sodu w modyfikacji własnej i wykryli obecność związków zawierających grupy SH w protoksylemie *Zea mays*.

Wartość grup SH w procesach morfogenezy u *Acetabularia mediterranea* ocenił w doświadczeniu swoim Brachet (1956). Wyraził on pogląd, że wzrost zawartości grup SH w komórkach, spowodowany dodaniem  $\beta$ -merkaptoetanolu, hamuje morfogenetyczne przemiany zarówno w organizmach regenerujących, jak i w rozwijających się zarodkach, natomiast dwutioglikol ma zwykle pobudzający wpływ na morfogenezę. Działanie merkapto-etanolu-etyloglukonamidu, substancji zawierającej grupę SH, która prawdopodobnie do komórek nie przenika, powoduje rozwojowe anomalie w organach. Wynikałoby z tego, że w procesach morfogenetycznych odgrywają rolę nieznane biochemiczne systemy, które włączają grupy SH i SS. Anson i Stanley (1941) wykazali, że aktywność wirusa choroby mozaikowej tytoniu można zahamować działaniem jodu. Wynik ten tłumaczyli utlenianiem przez jod grup sulfhydrylowych w cząsteczce wirusa.

Biorąc pod uwagę wpływ czynników chemicznych na grupy sulfhydrylowe w komórkach roślinnych, postanowiono przeanalizować zawartość tych grup w histogenach korzeni zarodkowych i rozwijających się w różnych temperaturach otoczenia.

#### MATERIAŁ I METODA

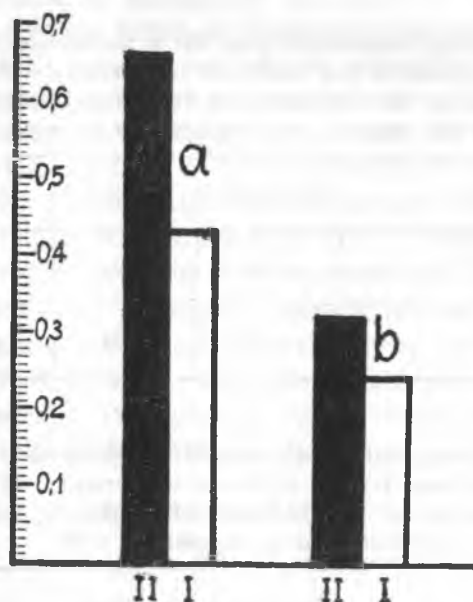
Nasiona kukurydzy (*Zea mays* L.) umieszczone w termostatach na dwu szalkach Petriego poddano kiełkowaniu — jedno w temperaturze  $+24^{\circ}\text{C}$  (I grupa doświadczalna), a drugie w temperaturze  $+4^{\circ}\text{C}$  (II grupa doświadczalna). Po 24 godzinach pobrano z obu grup doświadczalnych korzenie zarodkowe, a następnie wykiełkowane 2-dniowe. Nasiona kukurydzy umieszczone w termostacie w temperaturze  $+24^{\circ}\text{C}$  wykiełkowały piątego dnia po nastawieniu hodowli, natomiast w temperaturze  $+4^{\circ}\text{C}$  wykiełkowały ósmego dnia. Pobrane z temperatury  $+24^{\circ}\text{C}$  do badań korzenie miały w drugim dniu po wykiełkowaniu około 4 mm długości, natomiast z temperatury  $+4^{\circ}\text{C}$  nie przekraczały 2 mm. Korzonki utrwalano w 80% alkoholu etylowym z kwasem trójchlorooctowym wg metody Barnetta i Seligmana. Po 24 godzinach badany materiał odwadniano w alkoholach, prześwietlano w benzenie i zamykano w parafinie. Skrawki mikrotomowe grubości  $5\mu$  nanoszono na 3 szkiełka podstawowe. Do reakcji barwnej przy wykrywaniu białkowych grup SH używano roztworu DDD i czerni K (preparat 1). Drugi preparat stanowił kontrolę reakcji i służył do obliczania ekstynkcji. Kontrola polegała na użyciu barwnika czerni K bez inkubacji w DDD (2 preparat). Trzeci preparat niebarwiony zamykano w glicerożelu. Ilościowego określania grup sulfhydrylowych dokonywano w fotometrze C. Zeissa II.

Ekstynkcję grup SH obliczano wg wzoru Sandrittera w modyfikacji K u d e j k o dla 4 histogenów korzenia, a mianowicie: dermatogenu, periblemu, pleromu oraz dla kalyptrógeny. W każdej warstwie badano po 50 punktów w 3 kolejnych skrawkach, następnie oznaczano średnią wartość ekstynkcji dla poszczególnych warstw. Drugi z kolei pomiar dotyczył obliczenia średniej wartości ekstynkcji dla preparatów kontrolnych (bez inkubacji w DDD), trzecim natomiast było oznaczenie średniej wartości ekstynkcji dla preparatów niebarwionych. Mając średnie wartości ekstynkcji dla preparatów niebarwionych tzw. tło preparatu (T), dla preparatów barwionych na grupy SH (P<sub>2</sub>) oraz dla preparatów kontrolnych (P<sub>5</sub>) określano ekstynkcję grup SH (E<sub>SH</sub>) według wzoru:

$$E_{SH} = \frac{T}{P_2} - \frac{T}{P_5}$$

#### BADANIA WŁASNE I OMÓWIENIE WYNIKÓW

Jak wykazały nasze poprzednie badania (Miłkowska 1961, 1962) nad histochemicznym wykrywaniem grup sulfhydrylowych w merystematycznych komórkach korzeni *Vicia faba* L. i *Zea mays* L., a następnie grup SS w merystematycznych komórkach korzenia *Zea mays* L.



Ryc. 1. Białkowe grupy sulfhydrylowe (SH) w korzeniach kukurydzy (*Zea mays* L.). Średnie wartości ekstynkcji. I grupa doświadczalna (temperatura +24°C), II grupa doświadczalna (temperatura +4°C), a — korzenie zarodkowe, b — korzenie 2 dniowe  
 Protein-bound SH groups in the roots of *Zea mays* L. Mean values of extinctions. I — experimental group (temp. +24°C), II — experimental group (temp. +4°C), a — embryo roots, b — roots two days old

i *Allium cepa* L. swoisty odczyn barwny ograniczał się głównie do komórek inicjalnych, dermatogenu i czapeczki. Można więc było przez odpowiednie zmiany temperatury otoczenia przekonać się, czy występowanie białkowych grup sulfhydrylowych w obrębie tych warstw posiada wskaźnik stały czy zmienny.

Zastosowanie metody Barnetta i Seligmana pozwoliło przeanalizować umiejscowienie białkowych grup SH w poszczególnych histogenach korzeni kukurydzy, a następnie porównać je w obu grupach doświadczalnych. Dodatni odczyn na badane grupy SH wyrażał się szarofioletowym lub ciemnofioletowym zabarwieniem plazmy. Przy pominięciu inkubacji w DDD i zadziałaniu czernią K zabarwienie było brązoworude. Ekstynkcja była niższa i we wszystkich preparatach była liczbą stałą dla poszczególnych warstw (1,38). Przy użyciu fotometru wykazano niewielkie różnice ekstynkcji poszczególnych histogenów w korzeniach z temperatury  $+24^{\circ}\text{C}$  i  $+4^{\circ}\text{C}$ . Wartość ekstynkcji pozostawała w stosunku wprost proporcjonalnym do ilości występujących w komórkach białkowych grup SH (tab. 1 i 2).

Tab. 1. Średnie ekstynkcji białkowych grup SH w histogenach korzenia kukurydzy (*Zea mays* L.) pod wpływem temperatury  $+24^{\circ}\text{C}$   
Mean values of extinction of protein-bound SH groups in histogenes of the root of *Zea mays* L. at a temperature of  $+24^{\circ}\text{C}$

Grupy SH	dermatogen	periblem	plerom	kalyptrogen
Korzenie zarodkowe Średnie ekstynkcji	0,47	0,71	0,28	0,29
Korzenie 2 dniowe Średnie ekstynkcji	0,21	0,33	0,18	0,27

Tab. 2. Średnie ekstynkcji białkowych grup SH w histogenach korzenia kukurydzy (*Zea mays* L.) pod wpływem temperatury  $+4^{\circ}\text{C}$   
Mean values of extinction of protein-bound SH groups in histogenes of the root of *Zea mays* L. exposed to  $+4^{\circ}\text{C}$

Grupy SH	dermatogen	periblem	plerom	kalyptrogen
Korzenie zarodkowe Średnie ekstynkcji	0,51	1,08	0,51	0,54
Korzenie 2 dniowe Średnie ekstynkcji	0,24	0,66	0,21	0,18

Z uzyskanych wyników, zebranych w tabelach 1 i 2 z dwu różnych temperatur obliczono średnie wartości ekstynkcji dla korzeni (wszystkie histogeny łącznie). Wyniki tego zestawienia przedstawia tab. 3.

Tab. 3. Średnie ekstynkcji białkowych grup SH w histogenach korzenia kukurydzy *Zea mays* L. z temperatury +4°C i +24°C  
Mean values of extinction of protein-bound SH groups in histogenes of the root of *Zea mays* L. exposed to +4°C and +24°C

Temperatura	Średnie ekstynkcji	
	korzenie zarodkowe	korzenie 2 dniowe
+ 4°C	0,66	0,32
+24°C	0,43	0,24

Porównując otrzymane z dwu różnych temperatur wyniki stwierdza się różnice w zawartości białkowych grup SH w komórkach korzeni. Najwyższa ekstynkcja (0,66), a tym samym największa zawartość grup SH występowała w korzeniach zarodkowych II grupy doświadczalnej (+4°C), najniższa (0,24) w 2-dniowych korzeniach II grupy doświadczalnej (+24°C). Istniała też różnica ekstynkcji przy porównaniu korzeni zarodkowych I i II grupy doświadczalnej, która wyrażała się liczbą 0,23. W korzeniach 2-dniowych tych samych grup doświadczalnych wynosiła natomiast 0,08. Porównanie ekstynkcji korzeni zarodkowych i 2-dniowych I i II grupy doświadczalnej wskazywało również na obniżenie zawartości białkowych grup SH w korzeniach 2-dniowych i różnica ta w I grupie doświadczalnej wynosiła 0,19 a w II 0,34 (ryc. 1).

Jak można sądzić na podstawie naszych fotometrycznych obliczeń temperatura otoczenia nie pozostaje bez wpływu na zawartość białkowych grup sulfhydrylowych w histogenach korzeni zarodkowych i w czasie ich rozwoju. Podwyższenie temperatury oraz wzrost kiełka wyraźnie zmniejszały średnie ekstynkcji.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Anson M. L., Stanley J.: Jour. Gen. Physiol., 24, 679, 1941. wg Lisowski.
2. Brachet J.: Chemical Embryology (Interescience) New York 1950.
3. Kudejko T.: Badania histochemiczne grup sulfhydrylowych i disulfidowych w niektórych schorzeniach skóry z nadmiarem i nieprawidłowym rogowaceniem. (maszynopis).
4. Lisowski J.: Biologiczna rola grup SH. Postępy Hig. i Med. Dośw., 4, 401—429, 1956.

4. Miłkowska J.: Histochemiczne badania grup sulfhydrylowych w merystematycznych komórkach roślinnych. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska. Sec. D. 16, 441—445, 1961.
6. Miłkowska J.: Badania nad rozmieszczeniem grup SS w merystematycznych komórkach roślinnych. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska. Sec. D. 17, 325—332, 1962.
7. Roberts L. W.: Survey of Factors Responsible for Reduction of 2, 3, 5, — Triphenyltetrazolium Chloride in Plant Meristems. Science 113, 692—693, 1951.
8. Roberts L. W.: Histochemical Evidence of Protein—Bound SH Groups in Plant Tissues with 4-Iodoacetamidonaphthol-1. Science 124, 628, 1956.
9. Roberts L. W.: Protein-Bound Sulfhydryl Groups in Coleus Wound Meristems. Amer. Jour. Bot. 47, 2, 1960.
10. Roberts L. W., Lucchese G.: Sulfhydryl Localization and Tetrazolium Reductio. 1. Reversible Inhibition of Its Reduction by N-Ethyl Maleimide. Stain. Tech. 30, 291—298, 1955.
11. Torey R. M.: The Effect of Certain Metabolic Inhibitors on Vascular Tissue Differentiation in Isolated Pea Roots. Amer. Jour. Bot. 40, 525—533, 1953.

## РЕЗЮМЕ

Гистохимические исследования белковых групп SH проводились при помощи метода Барнетта и Целигмана на корнях споровых кукурузы (*Zea mays* L.) с выпущенными ростками, выросшими при температуре +4 С и +24 С. Применяя фотометр Цейсса, можно было определить сконцентрирование групп SH. Наиболее высокая концентрация белковых групп SH была в споровых клетках корней в температуре +4С (0,66), а наиболее низкая в клетках 2-дневных корней, выращенных при температуре +24С (0,24). При высокой температуре, по мере роста клеток, концентрация групп SH в плазме уменьшалась.

Рис. 1. Группы сульфгидроловые (SH % в корнях кукурузы *Zea mays* L.) Средняя оценка экстинкции, I группа исследования (температура +24 С), II группа исследования (температура +4С), а — корни споровые, в — корни 2-дней.

Табл. 1. Средние экстинкции групп SH в гистогенах корня кукурузы (*Zea mays* L.) под влиянием температуры +24 С.

Табл. 2. Средние экстинкции групп SH в гистогенах корня кукурузы (*Zea mays* L.) под влиянием температуры +4 С.

Табл. 3. Средние экстинкции групп SH для всех гистогенов корня кукурузы (*Zea mays* L.) в температуре +4 и +24 С.

## SUMMARY

By the method of Barnett and Seligman histochemical investigations of protein-bound SH groups were carried out on embryo roots and on two days old roots of *Zea mays* L. grown at a temperature of +4°C and +24°C. The concentration of SH groups was estimated by a Zeiss photometer. The highest concentration of protein-bound SH groups was found to occur in the cells of embryo roots at a temperature of +4°C (0.66), the lowest in two days old roots at a temperature of +24°C (0.24). The higher the temperature and the older the cell were the greater was the decrease of the concentration of SH groups in the cytoplasm.

