Badania nad chondriomem,
wakuolami i tłuszczami w ciągu rozwoju
osobnikowego *Pilobolus crystallinus* Bref.
(Observations sur le chondriome, les vacuoles et les
graisses au cours de l'ontogénie du *Pilobolus cristal-*
linus Bref.).

(Tablice XII—XIII).

Napisała

HALINA ŁOPIENSKA.

Pierwsze spostrzeżenia moje przy zastosowaniu metod mitochondrialnych poczyniłam nad aparatem *Pilobolusa* wytwarzającym zarodniki. Zgodnie z opisem i rysunkiem podanym przez Harpera¹⁾, młody trzonek zarodnionośny, nieco tylko na szczycie rozszerzony, wysłany jest cienką warstwą plazmy z równomiernie rozrzuconymi jądrami; metody mitochondrialne różnicują tę plazmę inaczej, aniżeli zwykle utrwalacze. Przy zastosowaniu metody Regaud widać na szaro fioletowym tle plazmy obficie rozrzucone utwory t. zw. chondriomu (w sensie Guilliermonda). Metoda rzeczona, nie różnicująca tłuszczów i jąder, niczem nie maskuje tych elementów. Są to na czarno wybarwione hematoksyliną ziarnistości i krótkie pałeczki, często dłuższe nitki lekko zgięte; wszystkie one występują w gęstych lub mniej obfitych skupieniach.

Forma zwakuolizowania młodej zarodni jest odmienna od zwykłych form wakuolizacji; sok komórkowy bowiem zawarty jest tu nie w okrągłych wakuolach, lecz w oczkach nieregularnej siatki plazmatycznej. Obrazy plazmy są podobne do poprzednich; obecność ziarnistości mitochondrialnych ujawniają preparaty z Flemminga bez kwasu octowego; styczne cięcia przez zarodnię utrwaloną metodą Regaud w okresie wakuolizacji dają obrazy wyjątkowo dokładne

¹⁾ Harper, A. Annals of Botany, 1899.

i wyraziste. Elementy chondriomu w postaci krótkich lub dłuższych pałeczek prostych lub łukowato zgiętych są rozsiane pojedynczo, nie wykazując żadnych skupień; wypełniają one równomiernie całą płaszczyznę przekroju (Tab. XII, 1). Z biegiem czasu warstwa plazmy zarodnikotwórczej grubieje, z piankowej staje się gąbczastą i uwytatnia okrągłe, normalne wakuole. Bogaty chondriom składa się z utworów nieco różnych od poprzednich; elementy jego tracą wyrazistość konturów, są mało foremne, widać pewne rozdrobnienia następujące wskutek ewentualnych podziałów, czy też wskutek zagęszczania się plazmy tak charakterystycznego dla tego okresu.

Mniej więcej w tem samym stadium rozwojowym zaobserwować się dają elementy chondriomu napęczniałe; przy szczegółowym badaniu odróżnia się pęcherzykowate nabrzmienia na końcach i identyczne niemal pęcherzyki leżące opodal w plazmie (Tab. XII, 3a i b). Przypominają nam one utwory wydzielnicze opisywane tak dokładnie w wielu komórkach roślinnych i zwierzęcych.

Zdaniem Harpera¹⁾ proces odcinania się t. zw. kolumelli stanowi skutek miejscowej wakuolizacji plazmy. Proces ten widoczny jest na wielu moich preparatach i przebiega zgodnie z opisem i rysunkami Harpera. We wczesnych stadiach widać szereg wakuol, leżących na przyszłej kopule podsadki; w miarę swego wzrostu wakuole spłaszczają się znacznie i zlewają brzegami. W tym czasie powstaje, zaczynając od brzegów trzonka zarodnikowego, wązka wakuola idąca ku górze; zlewa się ona z górnymi wakuolami, tworząc ciągłą szczelinę. Podział plazmy zarodnikotwórczej na terytorja rozpoczyna się szybko po utworzeniu podsadki w postaci brózd na brzegach zarodni. Zgodnie ze spostrzeżeniami Harpera¹⁾ łamanie plazmy odbywają się po linjach wakuol wydłużonych, kańciastych lub trójramiennych, które wskutek ucisku mas protoplazmatycznych, stanowią wązkie przestrzenie między segmentami podziałowymi; w ten sposób powstają nieregularne masy plazmatyczne, w których liczba jąder bywa bardzo różna. Naogół biorąc jądra w tym momencie rozwoju zarodni są o wiele większe od jąder z faz poprzednich. Widać to wyraźnie na takich skrawkach, które objęły brzeg i centralne części zarodni; w jej głębi, gdzie rozpadu plazmy jeszcze nie ma, z trudnością dopatrzeć się można maleńkich jąder, podczas gdy na brzegach gęsta plazma obfituje w jądra duże i wyraźne. Struktura jąder widoczna na rysunkach Harpera²⁾ nie uwytatnia się na moich

¹⁾ Harper, A. l. c., pag. 496.

²⁾ Harper, A. l. c., pag. 499.

preparatach z przyczyn czysto technicznych. Czas odbarwiania, stosowany dla różnicowania utworów chondriomu, był niewystarczający dla uwydatnienia budowy jąder; to też preparaty wykazujące chondriom, ujawniają jądra w postaci czarnych plam, rzadko kiedy ukazując jąderko. Podobnie, jak w poprzednich, tak również i w tym okresie rozwoju mitochondrialne metody stwierdzają istnienie chondriomu; najwyraźniejszy jest on przy stosowaniu metody Regaud (Tab. XII, 4).

Ostatnim etapem rozpadów podłużnych i poprzecznych plazmy jest podział wielojądrowych bloków na pojedyncze elementy z jednym jądrem w środku; jednostki te inaczej protospory (Harper)¹⁾ nie mają błon, nie są ostatecznymi zarodnikami *Pilobolus*, lecz stanowią tylko przejściową formę rozwojową. Protospora wykształcona stanowi grudkę lekko zaokrąglonej plazmy z jądrem w środku i z kilkunastoma elementami chondriomu, występującego w pewnej odległości od jądra (Tab. XII, 5). Protospory utrwalone metodą Regaud nie ujawniają jąder; czasem bladło wybarwione pęcherzyki wskazują miejsce, gdzie ono spoczywało.

Stadium następne, zwane przez Harpera¹⁾ embrjonalnem, charakteryzuje się przez wzrost i pierwszy podział jądra w protosporze. Podziałowi temu towarzyszy tworzenie się jednej większej wakuoli lub dwóch mniejszych. Zachowanie się chondriomu w powyżej wymienionym okresie, zarówno jak w następnych tak szczegółowo opisanych przez Harpera, o ile chodzi o jądro, pozostało dla mnie sprawą niezupełnie jasną. Preparaty wszakże z Regaud zdają się przemawiać za słusnością spostrzeżeń Lewitzkyego, albowiem i u *Pilobolus*, podobnie jak się to dzieje w konidjach u *Albugo Bliti*, wokół jąder umiejscawiają się ziarniste i pałeczkowate utwory mitochondrialne, tworzące nieregularne rozwichrzone skupienia (Tab. XII, 6). Zarodnik o dwóch ostatecznych jądrach posiada chondriom w postaci krótkich pałeczek i form ziarnistych rozsianych w plazmie (Tab. XIII, 7).

Co do chondriomu aparatu wyrzutowego, to najlepiej zorientować się można w jego charakterze nie na skrawkach mikrotomowych, lecz na preparatach utrwalonych i barwionych w całości; dają one nienaruszoną warstwę plazmatyczną i pozwalają na szczegółową analizę jej zawartości. Wąskie strumyki plazmy wypełniają długie, zlekka faliste, powyginane pałeczki, nie ujawniające zgrubień na końcach —

¹⁾ Harper, A. l. c., pag. 499.

typowe chondriokonty; ścielą się one wzdłuż strumieni plazmy i są odzwierciedleniem jej ruchu i kierunku (Tab. XIII, 8).

W młodej grzybni chondriom staje się wprost niedostrzegalnym, pomimo, że występował wyraźnie w zarodnikach, w starszych natomiast odnogach metoda Regaud uwidocznia liczne chondriokonty rozmieszczone w plazmie dość nieregularnie: są miejsca w strzępkach grzybni, w których chondriokonty leżą po kilka obok siebie, widać je jak grupami wkraczają do bocznych rozgałęzień; są jednak miejsca od nich wolne. Mitochondria ziarniste stanowią nieliczne wyjątki. Plazma grzybni powyższą metodą dobrze się utrwała, ukazując niewyraźne zarysy wakuol, blade kontury jąder i ziarna celluliny (Tab. XIII, 9).

Dodać wreszcie muszę, że beczułkowate wyrosty pojawiające się na grzybni przed utworzeniem się łodyżki zarodnionośnej, zapelnia obficie plazma zasobna w utwory chondriomu z wyraźną przewagą elementów wydłużonych nad ziarnistymi.

Z powyższego widać, iż występowanie chondriomu daje się stwierdzić zarówno w częściach wegetatywnych grzyba, jako też i we wszystkich niemal momentach rozwoju zarodni i zarodników.

System wakuol (inaczej „vacuome“ Dangearda) *Pilobolus crystallinus* badałam, stosując barwienie przyżyciowe czerwienią neutralną (1 : 10000).

Końce młodych strzępek grzybni *Pilobolus* w okresie wzrostu ujawniają, zgodnie z tem co obserwował Guilliermond¹⁾ ²⁾ u *Saprolegnia*, *Achlea* i *Leptomitus*, drobne kuleczki lub wydłużone utwory o bardzo silnej czerwonej barwie, znacznie mocniejszej niż wakuole, leżące dalej od miejsca wzrostu nitki (Tab. XIII, 10).

W części grzybni nieco starszej wyróżnia się kilka większych okrągłych wakuol, które bezwątpienia stanowią rezultat zlania się mniejszych analogicznych elementów. Barwa wakuol zazwyczaj bywa jednakowa, czasem jednak kolory ich są różne, co jak wiemy na zasadzie badań Ruhlanda³⁾ świadczy o różnym odczynie zawartego w nich płynu. Przy zastosowaniu barwników przyżyciowych, oprócz wakuol i widocznych w nich osadów, w grzybni *Pilobolus* występują na jaw ciała rozrzucone w plazmie niejednakowej wielkości, znacznie większe od jąder i barwiące się na kolor różowy. W utworach tych wyróżnia się ciemniejszy punkt w środku i wyraźne koncentryczne nawarstwienia. Ciała te nie redukują kwasu

¹⁾ Guilliermond, A. C. R. Ac. Sc., 1920.

²⁾ Guilliermond, La Cellule, 1922.

³⁾ Ruhland, W. Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Heft 2, 1921.

osmowego, jod w jodku potasu nie barwi ich zupełnie, zasady i kwasy działania nie wykazują, metody mitochondrialne utworów tych nie niszczą, hematoksylina wybarwia jednolicie, tuszując nawarstwienia. Ponieważ ziarna, zawarte w plazmie grzybni *Pilobolus*, wykazują te same cechy mikrochemiczne co ziarna opisane przez Pringsheima¹⁾ i Guilliermonda²⁾, przeto uważam je za ziarna celluliny. Zarodnik *Pilobolus crystallinus* w stadium spoczynkowem, barwiony przyżyciowo, ujawnia w samym środku plamę o nieregularnych konturach; plama ta początkowa daje wrażenie ciała stałego barwy karminowej. Niekiedy, oprócz silnie wybarwionego utworu centralnego, zaznaczają się w plazmie mniejsze podobne utwory (Tab. XIII, 11 a, b). W okresie pęcznienia zarodnik wybarwia się inaczej; pojawiają się w jego wnętrzu 2, 3, 4 wakuole, w których występują ziarnistości w różnej liczbie, kształcie i rozmiarach (Tab. XIII, 11 c, d). Zarodnik, silnie napęczniały przed momentem kiełkowania, traci swój zarys owalny, staje się okrągłym. Wypełnia go zwykle jedna duża środkowa wakuola, wyładowana ziarnami strąceń powstałych pod wpływem barwnika, stosowanego przyżyciowo. Czasem są one tak liczne, że maskują teren, na którym powstały (Tab. XIII, 11 e).

Zarodnik kiełkujący w momentach początkowych ujawnia tę samą dużą środkową wakuolę z licznymi ciałami strąceń. Wakuola rzeczona przy wzroście grzybni powiększa swą objętość, traci ziarna strąceń i wypycha prawie zupełnie zawartość plazmatyczną (Tab. XIII, 12).

Wakuole łądźki zarodnionośnej i aparatu wyrzutowego *Pilobolus* barwniki przyżyciowe wybarwiają bardzo słabo, nie dając żadnych osadów.

Tłuszcze.

Grzybnia *Pilobolus crystallinus* badana przyżyciowo, ujawnia małe, okrągłe kuleczki silnie odbijające światło, obdarzone ruchem Browna, przemieszczające się szybko w strumieniach plazmy. Zastosowanie prób mikrochemicznych (kwas osmowy, Soudan III) wykazuje niezbitcie charakter tłuszczowy tych elementów. Ilość i wielkość kulek tłuszczowych, zależy od miejsca w grzybni; młode strzępki zawierają kuleczki małe i w znikomej ilości starsze, a szczególnie końce strzępek są bardziej w nie zasobne.

Plazma młodej łądźki zarodnionośnej u *Pilobolus*, zupełnie analogicznie do tego, co się dzieje u *Saprolegnia*, *Leptomit* (Guillier-

¹⁾ Pringsheim, A. Ber. Deut. Bot. Ges., 1883.

²⁾ Guilliermond, A. La cellule, 1922.

mond)¹⁾ i *Achlea* (Guilliermond, Meyer, Rudolph)²⁾, jest tak tłuszczami wypełniona, że nawet przy przyżyciowym badaniu maskują one wszelkie utwory w plazmie zawarte.

Zaródź młodej zarodni, jeszcze przed pojawieniem się brózd podziałowych, wykazuje obfitość maleńkich kuleczek tłuszczowych (mniejszych od mitochondriów ziarnistych), układających się bezładnie lub tworzących łańcuszkowe lub groniaste skupienia.

Obrazy wakuolizującej się plazmy, protospor i dojrzewających zarodników noszą ten sam charakter. Plazma wypełniona kuleczkami tłuszczowymi zaznacza tylko jasne pola, stanowiące terytoria jądrowe.

Wyniki przeto mych badań streszczają się jak następuje:

1. T. zw. „chondriom“ Guilliermonda, ew. „plastidom“ i „cytom“ Dangearda (ojca), stanowią stały składnik plazmy *Pilobolus*.

2. W młodym trzonku, na którym tworzy się zarodnia, chondriom składa się z utworów ziarnistych (chondriosomów) i pałeczkowatych (chondriokontów)

3. Z biegiem czasu chondriokonty tworzą nabrzmienia pełne lub pęcherzykowate, izolujące się później.

4. W okresie tworzenia się brózd w zarodni przeważają chondriokonty o formie falistej nad ziarnistymi. Najpiękniej wykształcone elementy tej właśnie postaci występują w plazmie aparatu wyrzutowego.

5. Podobne elementy właściwe są również protosporom.

6. W trakcie powstawania zarodników elementy chondriomu tworzą rozwichrzone skupienia przyjądrowe.

7. Wykształcone dwujądrowe zarodniki rozporządzają chondriomem w postaci utworów ziarnistych i pałeczkowatych.

8. W strzępkach kielkującego zarodnika chondriom traci na wyrazistości, lecz odzyskuje właściwe sobie elementy w miarę wzrostu grzybni z przewagą zawsze chondriokontów nad formami ziarnistymi.

9. Wśród systemu wakuol, można wyróżnić u *Pilobolus*, w różnych okresach jego rozwoju, wakuole elementarne Dangearda i wakuole zwykłe. Pierwsze mają często — w zarodnikach i na szczytach strzępek — postać mitochromów („mitochromes“ P. A. Dangearda, 1925).

10. Tłuszcze stanowią stały element plazmy *Pilobolus*. Występują w postaci kropli obfitych w zarodnikach, w grzybni, masowo pojawiają się w trzonku zarodniotwórczym i licznie w plazmie zarodni.

¹⁾ Guilliermond, A. C. R. Ac. Sc., 1920.

²⁾ Meyer, A. Bot. Zeit. 1904; Rudolph, B. d. D. Bot. Ges., 1912.

Praca niniejsza została wykonana w Zakładzie Botaniki Ogólnej Uniwersytetu Warszawskiego, pozostającym pod kierunkiem Prof. Zygmunta Wóycickiego, któremu na tem miejscu składam serdeczne podziękowanie za cenne rady i wskazówki w toku badań.

Zakład Botaniki Ogólnej Uniwersytetu Warszawskiego.

Literatura cytowana w pracy.

- Dangeard, P. A. C. R. Ac. Sc., 1921.
 Dangeard, P. A. La cellule, 1925.
 Guilliermond, A. C. R. Ac. Sc. 1920.
 Guilliermond, A. La cellule, 1922.
 Harper, A. Ann. of Botany, 1899.
 Lewitzky, G. B. d. D. Bot. Ges., 1911.
 Meyer, A. Bot. Zeit. 1904.
 Pringsheim, N. B. d. D. Bot. Ges., 1912.
 Ruhland, W. Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, Heft 2, 1921.

Objaśnienie tablic XII i XIII.

Fig. 1 *a*. Plazma zwakualizowana z wyraźnymi elementami chondriomu (metoda Regaud, pow. 900); *b*. Te same utwory chondriomu znacznie powiększone (rys. schematyczny).

Fig. 2. Plazma wypełniona izolowanymi wakuolami; utwory chondriomu rozsypane w plazmie (metoda Regaud, pow. 900).

Fig. 3 *a*. Elementy chondriomu z wyraźnymi nabrzmieniami i pęcherzykami na końcach (metoda Regaud, pow. 900); *b*. Te same utwory chondriomu znacznie powiększone (rys. schematyczny).

Fig. 4 *a*. Pierwsze brzozy podziałowe idące od brzegów zarodni. Plazma wypełniona chondriomem (metoda Regaud, pow. 900); *b*. Plazma, zawierająca chondriom, podzielona na nieregularne bloki (metoda Regaud, pow. 900).

Fig. 5. Protospory z elementami chondriomu (Flemming słaby, pow. 900).

Fig. 6. Skupienia utworów chondriomu w miejscach podziałów jądrowych (metoda Regaud, pow. 900).

Fig. 7. Krótkie pałeczki i ziarna chondriomu w zarodnikach dojrzałych (metoda Regaud, pow. 900).

Fig. 8. Chondriokonty w strumieniach plazmy aparatu wyrzutowego, (Flemming słaby, pow. 900).

Fig. 9. Grzybnia z utworami chondriomu (metoda Regaud, pow. 900).

Fig. 10. Zakończenie młodej nitki grzybni, barwione przyżyciowo czerwienią neutralną, ukazujące liczne małe wakuole silnie wybarwione (*a*) i kropelki tłuszczu (*b*). Pow. 900.

Fig. 11 *a, b*. Zarodnik spoczynkowy, barwiony przyżyciowo czerwienią neutralną; wakuole centralne i barwne mają postać ciał o karminowej barwie; *c, d* zarodnik pęczniący, barwiony przyżyciowo czerwienią neutralną; wakuole na różowo wybarwione ujawniają wewnątrz t. zw. ziarna metachromatynowe (*a*); *e* zarodnik przed momentem kiełkowania, barwiony przyżyciowo czerwienią neutralną. Duża

centralna wakuola wypełniona ziarnami metachromatynowymi (a). W plazmie ziarna celluliny (b).

Rysunki robione z imm. Reich. $\frac{1}{12}$ i komp. okul. 6. Do reprodukcji powiększono trzykrotnie.

Fig. 12. Zarodnik w okresie kielkowania, barwiony przyżyciowo czerwienią neutralną. W wybarwionym systemie wakuol widać ziarna metachromatynowe (a); w plazmie ziarna celluliny (b) i kuleczki tłuszczowe (c). Do reprodukcji powiększono dwukrotnie.

Résumé.

Le plasma du Champignon *Pilobolus crystallinus* Bref., étudié au moyen des méthodes mitochondriales, abonde en éléments du chondriome aussi bien dans ses parties végétatives qu'à tous les moments du développement des sporanges et des spores. Les amas primitifs du plasma destiné pour la formation des spores présentent de nombreux éléments du chondriome: des granulations, de courts petits bâtonnets et des filaments plus ou moins longs, légèrement recourbés.

Le réseau irrégulier du plasma vacuolisé, au moment de la vacuolisation du jeune sporange, présente un tableau extrêmement net et précis: dans ce cas le chondriome ne forme point de ramas; il est dispersé sous forme de bâtonnets plus ou moins allongés, pliés ou courbés en arcs, à contours très distincts (pl. XII, 1 a).

Si le plasma possède une structure spongieuse, comme il arrive par exemple au moment de fractionnement du plasma en blocs irréguliers, son chondriome prend un aspect un peu différent du précédent: ses éléments perdent la netteté des contours, s'émettent probablement par la division ou bien peut-être sous l'influence de la condensation du plasma. C'est à la même phase, que l'on peut observer des éléments du chondriome gonflés, possédant des renflements vésiculeux aux extrémités (pl. XII, 3).

L'aspect de ces formes nous rappelle le tableau des formes sécrétoires étudiées si minutieusement dans diverses cellules des plantes vertes et des animaux.

Au moment du démembrement du plasma sporogène en blocs polynucléés et de la division de ces blocs en éléments simples — protospores, les méthodes mitochondriales nous révèlent de nombreux éléments du chondriome disséminés dans le plasma: de nombreux bâtonnets plus ou moins longs et des granulations qui sont moins nombreuses (pl. XII, 4, 5). La fine couche du plasma qui tapisse l'appareil projectif du sporange est remplie d'éléments longs, étroits, onduleux, légèrement recourbés et ne possédant point de

renflements aux extrémités — chondriocotes typiques. Ces éléments d'une netteté extraordinaire et aux formes accomplies suivent les courants du plasma (pl. XIII, 7).

Quant au mycélium, la méthode de Regaud nous a permis de constater, dans ses embranchements plus anciens, de nombreux chondriocotes dispersés confusément dans le plasma (pl. XIII, 9).

Un chondriome abondant remplit aussi les tonnelets fusiformes du jeune mycélium.

Le système vacuolaire a été étudié par la coloration vitale (le rouge neutre à 1 : 10.000). Le plasma des jeunes filaments du mycélium offre de petits globules ou des éléments allongés, fortement teintés de rouge; dans les parties plus anciennes du mycélium on distingue plusieurs vacuoles plus grandes, résultant de la réunion des éléments analogues plus petits. Ces vacuoles sont remplies d'une solution colloïdale plus ou moins concentrée de „métachromatine“. Cette solution dans les vacuoles des spores et des jeunes filaments est tellement concentrée, qu'elle semble un corps solide, absorbant fortement les colorants vitaux (pl. XIII, 10, 11, 12).

Les granulations intravacuolaires, qui sous l'influence des colorants vitaux présentent des corps précipités, sont parfois nombreuses et atteignent souvent des dimensions considérables, surtout aux phases précoces de la germination des spores, ainsi que dans les vacuoles finales du mycélium.

Les globules de graisses remplissent en profusion le plasma sporogène, gardant leur aspect morphologique au cycle du développement jusqu'au moment de la formation des spores adultes.

Institut de Botanique Générale de l'Université de Varsovie.

(Wpłynęło do redakcji 24 marca 1926).