PRZYZYNEK DO ZNAJOMOSCI METAPLAZJI.
W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH ZABIJANYCH PRZEZ GRZYBY
CONTRIBUTION A LA CONNAISSANCE DE METAPLASIE DES
CELLULES VÉGÉTALES PARASITÉES PAR DES CHAMPIGNONS

TADEUSZ DOMINIK.

Przy badaniach tkanek obumierających lub obumarłych u roślin, zabijanych przez grzyby pasożytnicze napotykamy w komórkach zjawiska i formy, które trudne są do objaśnienia. Nawet bardzo szczegółowe przeglądanie literatury nie daje wyjaśnień dostatecznych. W czasopiśmie poświęconym wyłącznie zagadnieniom zjawisk plazmatycznych „Protoplasma” znajdujemy masę prac na różne tematy, lecz żadna z nich nie rozwiązuje zagadnień, związanych z obumieraniem naturalnym, z pasożytnictwem. Zmiany opisywane przez autorów drukujących w czasopiśmie „Protoplasma” są wywoływane sztucznie, aby móc tłumaczyć zjawiska przyczynowo.

Ponieważ sporo opisów może tłumaczyć do pewnego stopnia zmiany powstające przy pasożytowaniu, więc na wstępie pracy podaję dotychczas osiągnięte wyniki.

O pewnego rodzaju syntezę pokusił się Seifriz (1939), który skarży się, że w tej dziedzinie badań brak jest uznanej terminologii. Wyzyskuje on materiał zwierzęcy i roślinny. Zmiany patologiczne wywołuje sztucznie i w rezultacie badań podaje następujące objawy śmiertelne w plaźmie.

1. zmiany barwy,
2. koagulacja,
3. zmiana lepkości,
4. ruchy Browna,
5. odmieszanie,
6. fragmentacja,

7. zniszczenie struktury,
8. zmiany w przepuszczalności,
9. zmiany powierzchni,
10. wysięki,
11. zmiany objętości,
12. podniecalność,
13. prądy w plazmie,
14. ruchy amebowate,
15. wzrost,
16. kształt,
17. wewnętrzne przystosowanie.

Nie będziemy się wgłębiać w analizę Seifritza, gdyż już samo wyróżnienie przez niego zmian patologicznych w plazmie wskazuje, że badania jego szły w kierunku opisywania zmian chorobowych, ale nie śmiertelnych. Natomiast naszym zagadnieniem są zmiany zachodzące przy pasożytowaniu, kończącym się śmiercią komórek napadniętych. Sprawa ta ściślej nie była przez nikogo badana. U starych autorów spotykamy takie powiedzenia: drobnodziarnista lub grubodziarnista, degeneracja plazmy, rozpad plazmy itp. (Soraue 1886, Hartig 1853).

Kwestia obumierania plazmy i jej zmian bywa bardzo różna w różnych wypadkach.

Przypadek zrzucił, że zająłem się zmianami metaplastycznymi w komórkach obumierających i ubumarłych owocu pigwy opadniętego przez *Entomosporium maculatum*. W tym wypadku mamy do czynienia ze zmianami heteroplastycznymi w sensie prozoplazji.

Aby pewne rzeczy móc potem tłumaczyć, wyszukałem w literaturze i podaję tutaj zdania różnych badaczy na temat wszystkich ciał, które w komórkach obumarłych i obumierających spotkałem. Takiego zestawienia nigdzie dotychczas nie znalazłem. logiczne są raczej zdekonstruowane.

Küster (1943) opisuje różne twory celulozowe, powstające na skutek pasożytowania *Ustilago maydis* w komórkach *Zea mays*. Wyróżnia kable, żagle, twory cystolitopodobne, główkowate zgrubienia, warstwy i sferokryształy w pochwach celulozowych wokół strzępek.

Podobne twory znalazł Neuwirth (1914) w *Cycas circinalis*, gdzie grzyb nie został oznaczony. Twory powyższe zostały zaliczone do celulozowej degeneracji protoplazmy. Twory te były opisywane przez Guttenberga 1905, Haberlandta 1925, Küstera 1925.

Gicklhorn (1932) opisał figury myelinowe (Myelinfiguren) w komórkach *Allium cepa*, które łudząco przypominają degenerację cellulozową protoplazmy w wypadku siatkowego zgrubienia błon.

W podręczniku anatomii patologicznej Küster (1925) w następujący sposób ujmuje degenerację plazmy:

1. degeneracja wakuolarna,
2. „ ziarnista,
3. „ tłuszczowa,
4. „ glikogenowa,
5. „ cellulozowa,
6. „ zgrubienia błon.

Jądra zdaniem tego autora mogą niszczyć przez:

1. degenerację wakuolarną,
2. „ ziarnistą,
3. zanik chromatyny.

Plastydy obumierają przez:

1. degenerację wokuolarną,
3. „ tłuszczową,
3. zanik i odbarwienie,
4. plazmoschizę (rozpad).

Według tego schematu degeneracja łączy się z rozpadem i zawieszeniem czynności życiowych. Ciała powstające są prostsze od ciał wyjściowych, tak że w stosunku do komórek zdrowych komórki pato-

W podręczniku cytologii Sharp (1931) trochę inaczej zapatrjuje się na degenerację patologiczną plazmy. Mówi on w patologicznych i anormalnych fizjologicznie tkankach mają miejsce objawy charakterystyczne, których znaczenia: celu dotychczas nie znamy.

Iljin (1935) podaje bardzo ciekawe, do pewnego stopnia objaśniające zjawiska przeze mnie opisane, kolejne stadia obumierania plazmy pod wpływem zwiększającego się stężenia roztworu NaCl. Najpierw cały protoplast ściąga się, potem koaguluje jądro i wychodzi poza cytoplazmę, widać wtedy, że składa się z dwu bryłek. Tuż koło jądra znajdują się plastydy, również wychodzące poza cytoplazmę. W dalszym stadium zaczyna koagulować cytoplazma, staje się ziarnista, otacza dość grubym płaszczem wodniczek, który oddzielony jest od plazmy widoczną błoną — tonoplastem. Wreszcie zdarza się, że cały płaszcz zdegenrowanej plazmy pęka, a tonoplast wydobywa się nazewnątrz jako pogięta i pómarszczona błona, wewnątrz której znajduje się często jeszcze wtórnie wytworzona błona (tonoplast wtórny) na zawartości skoncentrowanej wewnątrz wakuoli.

Natomiast Bank (1935) zwalcza pogląd opisujący tonoplast jako indywidualną błonę wodniczkową. Twierdzi on, że jest to jedynie fizykalna, optycznie niewyróżnialna membrana.

Ważne jest jeszcze zdanie Iljina (1933), że obumieranie komórek roślinnych szybciej i częściej odbywa się przez zalanie wodą niż przez wyschnięcie. Obumieranie przy nadmiarze wody odbywa się na skutek szybkiego pęcznienia plazmy, co powoduje zniszczenie jej struktury.

Balbach (1938) zajmuje się objawami obumierania protoplazmy pod wpływem słabych kwasów. Stwierdza wytwarzanie się wakuol oraz dyferencjację plazmy ziarnistą.

Noburo-Kamiya (1939) spostrzegł, że przy plazmolizie komórek skórki cebuli protoplast ściąga się w kształt sierpowaty lub kulisty z otworem w środku i otacza się cieniutką błoną, co do której autor nie doszedł, czy to jest błonka celulozowa, czy kożuszek zestalonej plazmy (Erstarrungshäutchen, Haplogenmembran).

Myślę, że zjawisko otaczania plazmy błoną taką przy dłuższej trwającej plazmolizie, mogłoby tłumaczyć różne formy zestalonych protoplastów w tkance zabitej przez pasożyty i powstawania odpornych na chemikalia flobafenów, szczególnie w obecności garbników. Ponieważ w badanym przeze mnie wypadku, w komórkach obumierających pojawia się masowo aleuron, gdy w sąsiadującej, zdrowej tkance wcale go nie ma, więc przytoczę tu najnowsze poglądy na sposób powstawania aleuronu w ogóle.

Frey-Wyssling (1938) jest przekonania, że ziarna aleuronu powstają z białek rezerwowych, znajdujących się w wakuolach. Każde ziarno ma powstawać przez wysychanie z pojedynczej wakuoli. Najpierw krystalizują fosforany magnezu i wapnia jako globoid, potem białko rezerwowe jako krystaloid, na końcu reszta wakuoli jako substancja podstawowa ziarna, złożona z rozpuszczalnych albumin.

Pogląd ten jest dość stary i znany, podpisali się pod nim Maschke (1859), Gris (1864), Pfeffer (1872), Dangeard, Wakker (1888) (cyt. wg Wielera 1943). Według tych autorów pierwotna wakuola aleurono-twórcza dzieli się na kilka pochodnych i przez zagęszczenie soku wytwarza się aleuron.

Wieler (1943) zwalcza wyżej opisany pogląd: „przypuszczenie, że ziarna aleuronu w gotowych przestrzeniach wodniczek powstają, oraz że błona ziarn tych jest błoną wakuolarną nie jest słuszne w stosunku do zbadanych przeze mnie ziarn aleuronu, pozbawio-

nych inkluzów. Raczej powstają one przez strącanie na miejscach, gdzie oba komponenty (plazma i sok komórkowy) stykają się. Błona ziarna aleuronu jest również skutkiem strącania się, a nie jest indywidualną błoną wodniczki."

Zdaniem Wielera w młodych komórkach aleuron występuje, albo koło jądra, albo w plazmie przy ścianie komórkowej, nigdy zaś w wakuoli.

W stadium młodym najdrobniejsze ziarna aleuronu można wykryć roztworem wodnym tlenku rtęciowego (wässeriges Quecksilberoxyd).

Ryc. 1.

Ziarna aleuronu według Wielera:
1 — sferyty, 2 — krystaloidy, 3 —
napęczniały krystaloid, 4 — krysta-
loidy z *Cydonia vulgaris*.

Tenże autor podaje, że wiadomości nasze o aleuronie nic nie postąpiły naprzód od czasów Hartiga (1853), Pfeffera (1872), Lüdtkego (1889), Kritzlera (1900) i innych.

Aleuron zachowuje się bardzo różnie w stosunku do odczynników chemicznych: 10% kwas octowy, 10% roztwór NaCl, rozcieńczony KOH w jednym wypadku rozpuszczają ciała aleuronu w innych wypadkach (u innych gatunków) wcale nie ruszają tych ciałek, z czego wniosek, że aleuron nie wszędzie jest jednakowy chemicznie lub, że ma różne wytrzymałe błonki. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ w roztworze pewne aleurony rozpuszcza, inne tylko po zadaniu pęczniają, NH_4Cl 5% rozpuszcza aleuron bardzo dokładnie, ale nie u wszystkich roślin jednakowo szybko.

Według Wiewera skoncentrowane roztwory NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , Na_2HPO_4 rozpuszczają błonę powierzchniową aleuronu. Chemizm tej błony nie został stwierdzony i zdaniem tego autora nie zostanie na drodze mikrochemicznej nigdy stwierdzony. Dla przykładu różnorodności ziarn aleuronu, z których pewne są bardzo morfologicznie zbliżone do skrobi, załączam rysunek kilku ziarn według Wiewera.

Badania moje, jak już wspomniałem, przeprowadziłem na owocach pigwy (*Cydonia oblonga* Mill.) z ogrodów Fundacji Kórnickiej koło Poznania, na których pasożytował grzyb *Entomosporium maculatum* Lév. Badania przeprowadzałem na materiale żywym. Skrawki ciąłem brzytwą zwykłą, dość grubo, aby nie uszkadzać komórek i mieć możliwość obserwacji na materiale żywym. Opis cytologiczny i badania były przeprowadzone w zwykłej wodzie, reakcje makro- i mikrochemiczne wprost w odpowiednich odczynnikach. Przy badaniach sporządzono kilkadziesiąt zdjęć mikroskopowych spod immersji, przy powiększeniu 1 200 x.

Rysunki wykonano ze zdjęć i z mikroskopu bezpośrednio. W celu porównawczym jeszcze raz wrócę do literatury i podam opis Wiewera (1943) aleuronu i jego występowania u *Cydonia vulgaris* Pers. (= *Cydonia oblonga* Mill.).

„U pigwy aleuron występuje w liścieniach i endospermie w formie kulistej porowatej (grubig). Składa się z substancji podstawowej i 1 — 2 małych wkładek (Einschlüsse). Substancja podstawowa barwi się roztworem Lugola na żółto. Po zadaniu fosforanem sodowym substancja podstawowa częściowo się rozpuszcza, wtedy dobrze widać krystaloid i tworzy kuliste (globoid? — pyt. autora). Gdy skrawki leżą w roztworze Lugola, a potem są oglądane w glicerynie, to struktura substancji podstawowej specjalnie dobrze jest widoczna. Plastrowate warstwy (Waben) o komórkowatej strukturze, które jedne na drugich są ułożone i mają okrągławy kształt, pęcznieją silnie w skoncentrowanym NH_4Cl , przyczem bardzo silnie powiększają się i rozchodzą. Wtedy widać kryształoty otoczone błonką”. Kryształoty te są uwarstwione, lecz Wiewer nie rozstrzygnął, co to są za kryształoty. Nie rozstrzygnął także czy kuliste sferyty, spotykane prócz kryształotów w ziarnach aleuronu pigwy są krystaloidami, czy globoidami. Stwierdził tylko, że nie rozpuszczają się w rozcieńczonym kwasie octowym.

Pod czarnymi placami wywołanymi przez pasożytowanie *Entomosporium*, gołym okiem widać zmienioną, ciemną tkankę nekrotyczną,

nieregularnie wciskającą się między zdrowy, jasny miękisz pigwy. Ta właśnie tkanka jest obiektem mych badań.

Opis ogólny tkanki zdrowej:

Jest to normalny miękisz śpichrzujący, komórki posiada cienko-błonne, mniej więcej równowymiarowe, kształtu kulistego lub kulistawo-wielościennego ubogie w protoplazmę, z wielkimi centralnymi wakuolami z przezroczystym sokiem komórkowym, zawierającym dużo garbników, komórek mechanicznych nie wiele — (znajdują się w głębszych warstwach). W komórkach opisywanego miększu innych materiałów zapasowych poza rozpuszczonymi w soku komórkowym nie wykryto. Reakcje na cukier, garbniki, kwasy są pozytywne. Przestwory międzykomórkowe występują, są niewielkie na przekroju mają kształt trójkątny.

Opis ogólny tkanki nekrotycznej:

Przekształcenia wywołane pasożytowaniem spowodowały utratę regularności komórek, błony ich są grubości różnej, niektóre przypominają sklerenchymę. Cała tkanka zabarwiona na kolor jaskrawo brązowy. Miejscami wytworzyły się duże nieregularne przestwory, na skutek zniszczenia wypełniającego je miększu. Błony komórkowe wybarwione są brązowo. Wewnątrz komórek widać bardzo silnie zróżnicowaną zawartość: ziarnistość drobną, ziarnistość grubą, sople, twory podobne do cystolitów, różne stadia plazmolizy, kondensację wakuol, nibygumy, kryształki, wreszcie blisko skórki wszystkie przestwory międzykomórkowe, a czasem i wnętrza komórek wypchane grzybnią podobną do bardzo drobnego i ścisłego miększu, tzw. pseudoparenchymą. Niektóre komórki wypełnione są swobodnymi strzępkami grzybni, czasem strzępki układają się w charakterystyczne haustoria.

Opis anatomiczny tkanki nekrotycznej:

W tkance objętej infekcją grzybową, jak już wspominałem, występuje zróżnicowanie komórek i ich zawartości, tak, że tkanka obumarła wygląda niejednolicie i jest więcej urozmaicona niż tkanka zdrowa mięksiszowa, z której powstała.

Obok komórek o błonach wybarwionych na kolor brązowo-czerwony, występują komórki o błonach bezbarwnych, nie różniące się na pierwszy rzut oka od komórek tkanki zdrowej.

Barwik, wybarwiający komórki obumierające i obumarłe jest bardzo odporny na działanie stężonych i rozcieńczonych kwasów i zasad. Nawet chlor nie niszczy go ani odbarwia.

W otaczającej nekrozę zdrowej tkance, komórki są regularne i mniej więcej równowymiarowe. Natomiast tkanka nekrotyczna złożona jest z komórek różnej wielkości o ścianach nieregularnie pogniętych.

Ryc. 2.

Opis w tekście.

Aby zorientować się w składzie tkanki nekrotycznej opiszę poszczególne komórki, przedstawione na ryc. 2.

1. Komórka o silnie zgrubiałych błonach. Błony wyraźnie uwarstwione, ciemno zabarwione na kolor sjeny palonej, zawierają inkluzję podobne do

kryształów, jednak są to inkluzy nieczynne optycznie (badane w mikroskopie polaryzacyjnym nie skręcają promieni świetlnych). Kształt inkluzów na przekroju nieregularnie kolisty lub kwadratowy o zaokrąglonych kątach. Wnętrze komórki puste. Jest to komórka kamienna.

2. Komórka o wielkich rozmiarach, błona komórkowa dość cienka, zabarwiona na kolor sjeny palonej. Wnętrze komórki wygląda na puste. Protoplastu nie widać. Natomiast wewnątrz występują ssawki grzyba, również zabarwione na kolor sjeny palonej. W pobliżu zakończenia ssawek można wykryć odczynnikami Giraud (AgNO_3 10% w CH_3COOH 1%) centra redukujące, co na rysunku zostało zaznaczone. Takich komórek jest bardzo dużo, lecz nie zawsze zawierają ssawki grzybowe.

3. Komórka znacznie mniejsza za to o błonie grubszej, również zabarwionej na kolor sjeny palonej. Wewnątrz niej żywe strzępki grzyba, które przeniknęły ze sklerotycznych skupień grzybni otaczającej komórkę. W strzępkach widać przegrody poprzeczne, a w ich plazmie drobnutkie wodniczki i jąderka. Protoplastu komórki pigwy nie można wykryć.

4. Komórka mała o kształcie nieregularnym, jakby pognieciona. Do błony komórkowej od wewnątrz przylega obumarła, skawałkowana plazma, wewnątrz której znajdują się punkty redukujące AgNO_3 z odczynnika Giraud.

5. Między rozepchniętymi komórkami miększu pigwy rozwinęła się zbita grzybnia, złożona z drobnych komóreczek, tzw. pseudoparenchyma podobna do sklerotycznych plech przetrwalnikowych u grzybów.

6. Komórki miększu pigwy w różnym stopniu wypchane substancją ziarnistą silnie redukującą AgNO_3 . Niektóre z komórek nie wykazują ziarnistości, lecz całe są bardzo ciemne, jakby jednolitą cieczą wypełnione.

7. Komórka wypełniona pseudoparenchymą grzyba.

8. Łoże z konidiami grzyba.

9. Kutikula, pokrywająca skórę, jest bardzo gruba w stosunku do światła komórek skórki, wynosi około . Przy zadaniu chlor-cynk-jodem powierzchniowa jej warstwa nie daje reakcji, natomiast część kutikuli, przylegająca do błon komórkowych epidermy przybrała jaskrawy pomarańczowo-czerwony kolor. Warstwa ta, reagująca z chlor-cynk-jodem waha się od 1,9 — 4 μ grubości. Tuż pod nią wyróżnia się liliowo zabarwioną, cienką błonę komórek skórki. Przy barwieniu sudanem III cała kutikula wybarwia się równomiernie.

Wszystkie wyżej opisane komórki (prócz epidermy z kutikulą) tworzą w tkance nekrotycznej bardzo nieregularnie wymieszany konglomerat.

Nie widać, aby na deferencjację takiego lub innego typu zmian miała wpływ bezpośrednia obecność pasożyta lub odstęp od grzybni.

Różne typy degeneracji spotyka się równocześnie w całej objętości tkanki nekrotycznej. Często bardzo zaawansowane stadia obumierania widzi się na skraju nekrozy, gdzie nie widać śladu strzępek. Wystarczają wydzielane przez grzyba fermenty.

Opis cytologiczny tkanki nekrotycznej:

Dość często spotyka się komórki obumarłe, których błony od wewnętrznej strony mają nałożone listewkowate zgrubienia dość nieregularne.

Ryc. 3.
Degeneracja celulozowa plazmy.

Ryc. 4.

Protoplast kurczy się, wyrzucając z siebie wszelkie organelle i ziarnistości.

larnie ułożone, robiące wrażenie jakby jakaś piana przylgnęła do błon. Jest to typ degeneracji celulozowej plazmy. Wnętrze takich komórek jest przeważnie zupełnie puste.

Pospolity obraz przedstawiają komórki, których protoplast kurczy się, odstaje od błon komórkowych, wyrzucając nazewnątrz do pustej przestrzeni, między błoną komórkową i protoplazmą wszystkie ziarnistości, jądro, plastydy, aleuron, jak to opisał Iljin (1935).

Wnętrze skurczonego protoplastu zajmuje przeważnie wakuola zawierająca duży % garbników.

Obraz jest bardzo podobny do plazmolizy.

Ryc. 5.

Plazma rozpada się na kawałki (fragmentacja).

Ryc. 6.

Protoplast skurczony, jakby w plazmolizie. Wnętrze zajmuje wakuola, która wkrótce zgaśnie.

Dalszym stadium rozwojowym jest utrata soku komórkowego przez skurczony protoplast, co czasem odbywa się przez popęknięcie

Ryc. 7.

Struktura drobnoziarnista degenerującej plazmy.
P — przestrzeń między błoną komórkową a protoplazmą.

a — jeszcze zdrowa plazma.

b — strefa początkującej degeneracji drobnoziarnistej.

c — wakuola.

otoczki plazmatycznej i samego tonoplastu, a innym razem znów wpływ soku odbywa się bez widocznego pęknięcia plazmy. Przypusz-

Ryc. 8.

Struktura gruboziarnista beleczek tworzących piankę degenerującej plazmy.

czalnie w pewnym momencie kurczenia się plazma staje się przepuszczalną.

Po zniknięciu wakuoli plazma kurczy się dalej, dzieli się na kawałki, garbuje się i wytwarza nieregularny konglomerat, który przybiera kolor brązowo-czerwony.

Momentu powstania nielicznych ziarn skrobi i aleuronu nie udało mi się uchwycić. W tego typu zdegenerowanych komórkach jest tych

Ryc. 9

Komórka wypełniona patologicznym aleuronem o średn. 2—9 μ .

ciał bardzo mało. Jest to typ degeneracji zaliczonej przez Seifriza (1939) do tzw. fragmentacji.

Ryc. 10.

Plazma zdegenerowana gruboziarniście. Widoczne różne formy aleuronu.

W podobny sposób odbywa się również degeneracja ziarnista (K ü s t e r 1925): protoplast kurczy się, wyrzuca jądro, skrobię i aleuron jak w poprzednim wypadku, a na granicy plazmy z wakuolą przy-

biera strukturę beleczkowatą i ziarnistą. Przy bliższym badaniu i największych powiększeniach w połączeniu z najwyższymi aperturami obiektywów można stwierdzić, że belecзки te, tworzące strukturę plazmy, są zbudowane z drobnutkich ziarenek, średnica ich waha się od 0,5 μ do niewidocznych wymiarów.

Struktura drobnoziarnista rozszerza się centrifugalnie coraz bardziej i można spotkać komórki, które wypełnione są całe tym typem ziarnistości.

Ziarenka te, badane mikrochemicznie dają pozytywne reakcje na białko, od ziarn aleuronu różnią się jedynie wielkością graniczącą ze strukturą submikroskopową. W obecności garbników przybierają kolor żółto-brązowy, są bardzo odporne na chemikalia, tak kwasy, jak zasady. Rozpuszczają się w stężonym kwasie azotowym, tworząc cytrynowo-żółty roztwór.

Nie zawsze proces ten biegnie do wytworzenia się struktury drobnoziarnistej, dość często powstaje ziarnistość o średnicy od 2 — 9 μ , zawsze z domieszką ziarenek drobnych o średnicy 0,5 μ .

Ziarnistość gruba składa się z bardzo regularnych kulek pełnych oraz z utworów czaszowatych z wgłębieniem w środku, obwarzankowatych, wreszcie z kul wewnątrz pustych.

Część ziarnistości w komórkach o tym typie degeneracji ma kształt kulisty, ale jest złożona z 2 — 4 części, zupełnie jak krystaloidy aleuronu przedstawione przez W i e l e r a (1943) na ryc. 1 i na ryc. 11 przez mnie. Jednakże tego rodzaju ziarna występują raczej nazewnątrz rozpadniętej w drobne ziarna plazmy i są właściwym aleuronem.

Wszystkie twory gruboziarnistej degeneracji plazmy są wybarwione na kolor czerwono-brązowy, tak ziarnistość kulista, która powstała z plazmy, jak i właściwy aleuron. Istnieje jednak pewna różnica w chemizmie tych dwu białkowych substancji, gdyż po wymacerowaniu preparatu przez 20 dni w roztworze nasyconym $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ i potem po zadaniu FeCl_2 (aby wykryć rozłokowanie garbników ziarnistość gruba pochodzenia plazmatycznego została bez zmiany zabarwiona, podczas gdy właściwe ziarna aleuronu (krystaloidy) stały się zupełnie bezbarwne prawie przezrocyste.

Ciekawą rzeczą jest, że twory kuliste, powstające z plazmy jak i wybarwiony aleuron na kolor oliwkowo-brązowy w obumarłej tkance nie daje reakcji z odczynnikiem Millona. Jest to przecież białko, a jednak przez impregnację garbnikami i tym nadzwyczaj trwałym pośmiertnym barwnikiem brązowym, nieznanego pochodzenia i skła-

du chemicznego, staje się nieczułe na reakcje białkowe. Dopiero stężony HNO_3 rozpuszcza te twory, zabarwiając się na cytrynowo-żółty kolor (pod mikroskopem).

Wydaje się, że Hauser (1937) ma słuszość twierdząc, że garbniki garbują białko, zmniejszając jego przepuszczalność i odgrywają rolę koloidów ochronnych wewnątrz komórek roślinnych.

Po 4-godzinnej maceracji w 10% KOH wyżej opisana ziarnistość została bez zmian.

Ryc. 11.

Ziarnistość złożona, przypominająca krystaloidy opisane przez Wielera.

Natomiast całość preparatu zabarwiła się równomiernie na kolor różu angielskiego. Widocznie barwik czerwono-brązowy został częściowo rozpuszczony w KOH.

Skrawki poprzednio macerowane w 10% KOH, zostały wypłukane starannie w wodzie destylowanej i potem moczone w dużym naczyniu w wodzie destylowanej przez 3 godziny.

Następnie zadałem je $\text{HCl } n/1$. Kutikula zaczęła się rozpadać. Natomiast gruba ziarnistość pozostała bez zmian.

Po odciągnięciu $\text{HCl } n/1$ zadałem te same skrawki stężonym HCl . Kutikula przybrała żółto-zielonawy odcień. W niektórych zaś komórkach część ziarnistości, znajdująca się poza skurczoną plazmą, w przestrzeni wolnej w obrębie błony komórkowej, zabarwiła się bardzo intensywnie na kolor siny, atramentowy.

Najczęściej ciała te leżą poza zdegenerowaną plazmą, ale spotyka się też luźno leżące między inną ziarnistością plazmy, nie rea-

gującą na HCl zabarwieniem. Ciałka reagujące na HCl mają dość regularny kształt elipsoidalny, wymiary ich wahają się od $2 - 9 \mu$, x $2 - 5 \mu$.

Prócz tej, rzucającej się w oczy ziarnistości, zareagowała też grupkami ziarnistość drobna o wymiarze $0,5 \mu$, lecz znacznie słabiej.

Również ziarnistość z otworem w środku zabarwiła się na kolor sino-fioletowy, ale tylko okazy, które nie były wybarwione na brązowo.

Ryc. 12.

Część ziarnistości zabarwiła się HCl stężonym na kolor atramentowo-siny.

Te ostatnie pozostały bez zmian. Zabarwienie ziarn z otworami było znacznie słabsze niż ziarn pełnych.

Ziarna, które otoczone były, resztkami plazmy, zabarwiły się znacznie słabiej niż leżące luźno.

Skrawki po odciągnięciu HCl wypłukałem w wodzie destylowanej, następnie stwierdziłem, że zabarwienie to nie znikło. Po zadaniu tychże skrawków alkoholem etylowym 97° zabarwienie sine natychmiast znikło.

Alkohol został odparowany i skrawki zadane ponownie HCl stężonym — zabarwienie znów pojawiło się. Początkowo było jasnoniebieskie, potem stopniowo ziarenka przybrały kolor ciemno-siny. Reakcję z alkoholem i kwasem solnym powtórzono kilka razy zawsze uzyskując identyczny wynik.

Następnie te same skrawki wypłukane w wodzie destylowanej zamiast alkoholem, nadałem amoniakiem w postaci Liquor ammonii caustici. Zabarwienie sine znikło natychmiast. Kontury ziarnistości zaostriżyły się, cały preparat stał się przejrzysty. Barwik czerwono-brunatny (sjena palona), gdziekolwiekby się w skrawku nie znajdował pozostał bez zmiany. Po pewnym czasie zauważyłem pęcznienie błon i rozpuszczanie się ich części zewnętrznych, pojawia się na błonach wyraźne uwarstwienie. Znowu szybko przepłukałem skrawki w wodzie destylowanej i nadałem stężonym HCl.

Zabarwienie sine już nie wróciło.

Wnioskuje więc z tego, że:

albo ta część ziarnistości rozpuściła się całkowicie w NH_4OH ,

albo związek reagujący poprzednio został wylugowany przez NH_4OH ,

albo też została rozpuszczona błonka na tych ziarnach, która dawała reakcję barwną z HCl.

Która alternatywa jest prawdziwa, nie zdążyłem stwierdzić. Wyżej opisana ziarnistość rozpuszcza się w HNO_3 dając cytrynowo-żółte zabarwienie.

Dlaczego tak szczegółowo rozpisuję się na temat reakcji z HCl?

Otóż szukałem w dostępnej mi literaturze podobnej reakcji z HCl stężonym, pytałem chemików organików, co o tym związku myślą i nigdzie nie znalazłem odpowiedzi. Chemicy do stwierdzenia tego związku chcieli, abym dostarczył pół kilo tej substancji, to postarają się ją oznaczyć.

Z drugiej strony wszelkie barwne reakcje mikroskopowe są cenne. Nie mam ani sposobu, ani środków, ani wiedzy, aby ten problem rozwiązać, zatem opisuję to odkrycie, aby zainteresowani mogli się nim głębiej zająć.

Jeśli chodzi o moje zdanie, to jest to przypuszczalnie reakcja z błonką na ziarnach aleuronu; za takie bowiem ziarnistość tą uważam.

Błonka niedostatecznie wybarwiona owym równie tajemniczym barwikiem pośmiertnym, koloru sjeny palonej, może też niedostatecznie wygarbowana, daje barwną reakcję z HCl, pojawia się siny kolor.

Błonka wybarwiona na brązowo nie daje tej reakcji, jest bardzo odporna na wszelkie odczynniki.

Wniosek z tego, że barwik pośmiertny, dotychczas zagadkowy, jest charakteru kwaśnego. Może to mieszanina garbników z białkami.

Przybieranie przez błonkę aleuronową koloru sinego w obecności HCl stężonego, przypomina żywo reakcję floroglucynową ze stężonym

kwasem solnym i drewnem. Tylko, że tu mamy dwie niewiadome, związek barwiący i skład chemiczny błony aleuronowej. W i e l e r (1943) zaś nie robi nadziei, aby chemizm błonek został kiedykolwiek na drodze mikrochemicznej stwierdzony.

Ryc. 13.

Skrobienie w komórkach tkanki nekrotycznej.

Inna seria skrawków z tejże tkanki nekrotycznej została zadana bez żadnych wstępnych reakcji roztworem KJ + J.

Bardzo nieznaczna część ziarnistości wewnątrz komórek zabarwiła się na kolor ciemno-fioletowy. Po zadaniu 10% KOH ziarna te rozpu-

Ryc. 14.

Sople czyli pseudocystolity z pęczniejącej i ześluzowanej błony komórkowej.

ściły się. Zatem w komórkach nekrotycznych pigwy występuje skrobienie, podczas, gdy zdrowa tkanka jej nie zawiera. Średnica ziarn waha się od 5 — 7,5 μ . Większość ziaren była otoczona bezbarwną otoczką, jak to przedstawia rysunek 13.

Plastydy zawierają po 1 — 5 ziaren skrobi. Niektóre ziarna były złożone z 2 — 3 zrośniętych ze sobą ziarenek mniejszych. Inne typy ziarnistości, poprzednio opisane, lekko żółkły pod wpływem roztworu Lugola.

Do poprzednio opisanej degeneracji plazmy w obrębie komórek dochodzi jeszcze zjawisko rozpadu błon komórkowych.

Substancja międzykomórkowa wydaje się być rozluźniona, oraz miejscami przerośnięta strzępkami grzyba.

Właściwa błona pęcznieje i śluzowacieje od strony wewnętrznej komórki. Tworzą się sople nibycystolity (ryc. 14), krople, wysięki itp.

Chemizm tych nowotworów błony komórkowej nie jest jasny. Sople i pseudocystolity nie są już cellulozą, gdyż reakcja z chlor-cynk-jodem na nich jest ujemna. Są to jakby substancje gumowate.

Przy barwieniu preparatów Sudanem III (roztw. alkoh. + glyc.) tworzy te lekko zabarwiły się na kolor pomarańczowy. Przeważnie gdzie komórki wykazują gumowatą degenerację błon, tam wnętrza komórek są pozbawione ziarnistej degeneracji plazmy. Robią wrażenie, jakby w ogóle protoplastu nie było.

Wypada, opisując zmiany cytologiczne żywiciela wspomnieć też o cytologii grzyba. W pierwszym rzędzie nasuwa się fakt, że błony komórkowe *Entomosporium maculatum* absolutnie nie są jednolite, lecz strukturę ich badać można dokładnie dopiero po wysrebrzeniu odczynnikiem Giraud.

Zredukowane srebro bowiem, odkłada się na zewnętrznej i wewnętrznej powierzchni błon. Dopiero wtedy można zobaczyć, że grzyb ten nie posiada gładkich błon, lecz pofalowane licznymi otworkami przedziurawione, zaopatrzone nieregularnymi wypustkami i zgrubieniami od wewnętrznej strony.

Wnioski:

W pracy niniejszej stwierdziłem, że tkanka degenerująca pod wpływem pasożytniczego grzyba, nabyła więcej skomplikowanych cech i związków, niż tkanka zdrowa posiadała. Mianowicie, na skutek pasożyta pojawiły się w komórkach:

1. skrobia,
2. aleuron,
3. nieregularne, listowate zgrubienia błon komórkowych,
4. barwik czerwono-brązowy, impregnujący błony komórkowe, protoplasty i różne organoidy komórkowe,

5. pseudocystolity i sople,
6. drobna ziarnistość plazmy, która zdaniem Küstera (1932) jest plazmą ziarnistą,
7. gruba ziarnistość plazmy, moim zdaniem jest to forma patologicznie powstającego masowo aleuronu prostego.

Przypadkowo odkryłem, że stężony kwas solny wybarwia część aleuronowych ziarn, na kolor atramentowo-siny, która to reakcja dokładnie opisana w pracy, zasługuje na szczególną uwagę. Stwierdziłem, że barwik wywołany pasożytowaniem, czerwono-brązowy (sjena palona) jest związkiem ochronnym, uniemożliwiającym większość reakcji mikrochemicznych.

Z powyższego wynika, że tkanka obumierająca, na skutek opanowania przez pasożyta, może komplikować swój skład fizyczny i chemiczny w sensie urozmaicenia i wzbogacenia się, mimo, że procesy te kończą się również śmiercią.

Na szczególną uwagę zasługuje różnorodność form aleuronu:

1. drobnoziarnisty, kulisty bez inkluzów,
2. krystaloidy proste i złożone,
3. gruboziarnisty, kulisty z otworem w środku,
4. pierścieniowaty,
5. elipsoidalny.

Gdy tymczasem według Wielera (1943) u pigwy zdrowej aleuron występuje jedynie w liścieniach i endospermie w formie pękających ziarn chropowatych z 1 — 2 inkluzami.

* * *

Na marginesie niniejszej pracy zaznaczyć należy, że opis *Entomosporium maculatum* Léw. pospolicie podawany we florach i kluczach nie odpowiada rzeczywistości, dzięki czemu oznaczenie tego grzyba, przy dokładnym badaniu jest niemożliwe.

Powodem jest, że *Entomosporium maculatum* nie tworzy, jak tego chce Lévêillé i co podaje również Saccardo, ani perytecjów ani pyknid, lecz tworzy łoża (= podkładki, Lager, stroma), przykryte jedynie kutikulą żywiciela. Rzadko kiedy na kutikuli wisi trochę komórek oderwanych z łoża, co przy pobieżnym badaniu można wziąć za słabo rozwiniętą ściankę pyknidy.

Dla porównania przytoczę wyjątki z oryginalnych opisów. Saccardo — *Sylloge Fungorum...* Vol. III, str. 657, rok 1884 — „*Pethecia hemisphaerico-applanata*, *astoma*, *atra* (spuria). *Sporulae cruciatio-tetramerae...*“

Entomosporium maculatum Léw. — „*Peritheciis epiphyllis applanatis*, *atris*, *subastomosis* — *sporulis* more generis, 4 — *cellularibus...*“

Zupełnie inny jest opis Sorauera oparty na materiale faktycznym.

Sorauer P. — *Handbuch der Pflanzenkrankheiten*. II Teil Berlin 1886, str. 337.

„Die in der Mitte der braunen Flecken entstehenden dem blossen Auge ziemlich schwer kenntlichen, schwarzen, plankonvexen Auftreibungen öffnen sich meist spaltenförmig, indem die Cuticularschichten der Oberhaut gesprengt werden. Die Ränder der abgehobenen Cuticularschichten bleiben anfangs noch glockenförmig über dem dünnen Lager (Stroma) der nun kenntlich werdenden Conidien, welche die Auftreibung veranlasst haben: später schlagen sich die Ränder zurück und das Conidienlager erscheint jetzt als eine stumpf-braune, völlige, flache Austreibung“.

Nigdzie nie ma tu mowy o pykniadach i to jest słuszne. Opis Sorauer'a zgadza się z moimi obserwacjami. Dziwne tylko, że Sorauer nie zakwestionował stanowiska systematycznego tego gatunku. Jeszcze dziwniejsze to, że w piątym wydaniu Sorauer — Appel-Handb. der Pflanzenkrankheiten — został zarzucony wzorowy opis Sorauer'a i podany błędny opis Lévillé.

Skoro jednak *Entomosporium maculatum* Lév. nie tworzy pykniid, nie może należeć do rzędu *Sphaeropsidales*, rodziny *Leptostromaceae* — *Phragmosporae*.

Natomiast ponieważ gatunek ten tworzy podkładki (stroma) winien być zaliczony do rzędu *Melanconiales*, rodziny *Melanconieae* — *Hyalophragmiae*, w której to rodzinie wiele rodzajów i gatunków tworzy zarodniki złożone, których komórki zaopatrzone są szczeciniowatymi wyrostkami. A taki typ zarodników tworzy i *Entomosporium maculatum*.

Z Wydziału Ochrony Roślin

Państwowego Instytutu Naukowego Gospodarstwa Wiejskiego

R e s u m é.

L'auteur a étudié la tissu nécrotique du coing (*Cydonia oblonga*) parasitée par l'*Entomosporium maculatum* Lév. Les recherches ont été exécutées sur des taches nécrotiques sous l'épiderme de fruits.

On a constaté que la tissu nécrotique peut sous l'influence du champignon parasitaire se compliquer en sens d'acquérir des nouveaux substances plus compliquées que les substances de la tissu saine.

Pendant nos recherches sur les cellules nécrotiques nous avons trouvé: l'amidon; l'aleurone en grains très divers; renflements celluloseux en listel sur des parois cellulaires; pseudocystolithes, et des grossissements des parois cellulaires en sens de gommose; un pigment du séné brulé (de rouge-brun) très résistant contre des réactives tant acides que basiques, qui joue un rôle du corps protecteur en cellules; enfin on trouve en cellules dégénérées une granulation albuminoïde très fine, que l'auteur tient comme structure granuleuse du plasma fixé par des acides tanniques et une granulation grossière globuleuse albuminoïde, morphologiquement semblable au grains d'aleurone, que l'auteur tient comme l'aleurone pathologique sans incluses.

Tous les organoïdes des cellules pathologiques sont imprégnés par ce pigment rouge-brun, du caractère acide, qui gêne tous les réactions microchimiques.

En tissu sain on ne trouve pas ces compositions chimiques, nommées ci dessus. Les grains d'aleurone, par exemple chez le coing, Wieler (1943) a trouvé seulement en cotyledons et en endosperme en forme des globules avec 1 — 2 incluses.

* * *

En marge du ce travail par excellent anatomo-cytologique il faut signaler que la description d'*Entomosporium maculatum* Lev. ne correspond pas à la réalité. L'éveillé et puis Saccardo écrivent que ce champignon produit des pycnides (strictement ils mentionnent des périthèces). En réalité c'est ne sont pas des pycnides, mais du stroma qui est longtemps recouvert par de cuticule soulevée en bourrelet d'épiderme du coing ou du feuille. Cette observation a déjà fait Sorauer (1886), mais sa publication a passé sans conséquences.

En tout cas l'*Entomosporium maculatum* doit se trouver en ordre **Melanconiales**, famille **Melanconiées** — **Hyalophragmiées**.

WYKAZ LITERATURY.

1. Balbach H. — Beiträge zur Kenntnis der Necrose des pflanzlichen Protoplasmas. „Protoplasma“ Bd. XXIX. Leipzig 1938.
2. Bank O. — Zur Tenoplastenfrage. Tamže, Bd. XXIII 1935.
3. Frey-Wyssling A. — Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate. „Protoplasma Monographien“, Bd. XV. Berlin 1938.
4. Guttentberg H. — Beiträge zur physiologischen Anatomie der Pilzgallen. Leipzig 1905.
5. Guilliermond A. — La structure des cellules végétales à l'ultramicroscope. „Protoplasma“ Bd. XVI. Leipzig 1932.
6. Gicklhorn J. — Intracelluläre Myelinfiguren und ähnliche Bildungen bei der reversiblen Entmischung des Protoplasmas. „Protoplasma“ Bd. XV. Leipzig 1932.
7. Haberlandt G. — Über das Verhalten gebürsteter Laubblätter von *Alnus glutinosa*. Ber. d. Deutsch. Bot. Gesel. Bd. 43 1925.
8. Hauser W. — Ueber den Einfluss von Gerbstoffen auf Permeabilität und Osmose. „Protoplasma“ Bd. XXVIII. Leipzig 1937.
9. Hauser W. — Zur Physiologie des Gerbstoffes in der Pflanzenzelle. Tamže. Bd. XXVII.
10. Iljin W. — Das Absterben der Pflanzenzellen in reinen und balancierten Salzlösungen. Tamže. Bd. XXIV. 1935.
11. Iljin W. — Über Absterben der Pflanzengewebe durch Austrocknung und über ihre Bewahrung vor dem Trockentode. Tamže Bd. XIX. 1933.
12. Küster E. — Pathologische Pflanzenanatomie. 3 Auflage, Jena 1925.
13. Küster E. — Die Pflanzenzelle. Jena 1935.

14. Küster E. — Über zellulösige Protoplasma degeneration in Pilzwirtszellen. „Protoplasma“ Bd. XXXVIII. 1943.
15. Küster E. — Pathologie der Pflanzenzelle, Teil I. Pathologie des Protoplasmas. „Protoplasma“ Monographien“ Bd. III. Berlin 1929.
16. Küster E. — Pathologie der Pflanzenzelle. Teil II. Pathologie der Plastiden. Tamze. Bd. XIII. 1937.
17. Küster E. — Die Protoplasma blasen der Caulerpa (Beiträge zur Pathologie des Protoplasmas). Tamze. Bd. XVI. Leipzig 1932.
18. Lepeschkin W. — Zell- Necrobiose und Protoplasma-Tod. „Protoplasma Monographien“ Bd. XII. Berlin 1937.
19. Lepeschkin W. — Zellenresistenz und molekularer Protoplasma bau. „Protoplasma“ Bd. XXXVI. Leipzig 1943.
20. Molisch H. — Mikrochemie der Pflanze. Jena 1921.
21. Nauwirth M. — Ein endoparasitischer Pilz in den Samenanlagen von *Cycas circinalis*. Oesterr. Bot. Zeitschr. Bd. 64 1914.
22. Noburo Kamiya. — Zytomorphologische Plasmolysestudien an *Allium-Epidermen*. „Protoplasma“ Bd. XXXII. Berlin 1939.
23. Seifriz W. — Pathological changes in protoplasm „Protoplasma“ Bd. XXXII. Berlin 1939.
24. Seifriz W. — The alveolar structure of protoplasm. „Protoplasma“ Bd. IX. Leipzig 1930.
25. Sorauer-Appel. — Handbuch der Pflanzenkrankheiten. Berlin 1928 — 1932.
26. Sorauer P. Handbuch der Pflanzenkrankheiten. Berlin 1886.
27. Sharp-Jaretsky. — Einführung in die Zytologie. Berlin 1931.
28. Tunmann-Rosenthaler. — Pflanzenmikrochemie. II Aufl. Berlin 1931.
29. Weber F. — Protoplasmatische Ungleichheit morphologisch gleicher Zellen. „Protoplasma“ Bd. XV. Leipzig 1932.
30. Weber F. — Protoplasmatische Pflanzenanatomie. „Protoplasma“ Bd. VIII. Leipzig 1930.
31. Wieler A. — Über Sphaerite. Kolloid-Zeitschrift. Bd. 70 1935.
32. Wieler A. — Die Sphaeritnatur der Stärkekörner und einiger anorganischer Verbindungen. „Protoplasma“ Bd. XXXI. 1938.
33. Wieler A. — Die Bedeutung der Innenhaut für die Zelle und die Struktur der sekundären Verdickungsschichten. „Protoplasma“ Bd XXXIV. 1940.
34. Wieler A. — Der feinere Bau der Aleuronkörner und ihre Entstehung. „Protoplasma“ Bd. XXXVIII. 1943.