Występowanie oksyflawonów i flawonów w generatywnej komórce irysa

On the occurrence of oxyflavones (flavones?) in generative cells of the Iris

STEFAN KRUPKO

W początkach moich wykładów na Uniwersytecie w Johannesburgu (Unia Połudn.-Afrykańska) chciałem w październiku 1946 r. przygotować kultury łagiewek dla ćwiczeń ze studentami z cytologii roślin. Jeszcze z moich doświadczeń przed 1939 r. na Uniwersytecie Warszawskim wiedziałem, że ładne łagiewki tworzy pyłek żółtych irysów, wysiany na szkiełkach przykrywkowych, smarowanych pożywką i umieszczanych na szklanych pierścionkach. A więc i tym razem skorzystałem z ogromnej ilości kwiatów żółtych irysów, odmiany zwanej przez holenderskich hodowców „hiszpańską“, sprzedawanych w sklepach z kwiatami. Bliską optymalnej okazała się pożywka o składzie: 15% sacharozy, 2% agaru, 2% żelatyny*, do której czasem dodawałem kwasu bornego w rozcieńczeniu 0,001%.

Okazało się, że i tym razem irys daje piękne i długie łagiewki i bardzo ładne przyżyciowe obrazy generatywnej komórki w łagiewce i spermów. Ale tym razem zauważyłem pewien szczegół w generatywnej komórce, którego, byłem pewien, nie widziałem w moich wysiewach w Warszawie. Oto na obu spiczastych końcach komórki generatywnej w łagiewce widać było stłoczone nagromadzenie „żółtych ciałek“, kształtu nieprawidłowo okrągłego. Nasunęło się od razu pytanie, czy ten żółty barwnik występuje w wakuolach, czy w plastydach lub chondriosomach? Żeby rozstrzygnąć to pytanie, zastosowałem: a. przyżyciowe barwienie czerwinią obojętną i zielenią Janusową, b. reakcje z KJ+J i z 1% AgNO_3 .

Przyżyciowe wybarwienia bezpośrednio w kropli powyższych barwników nie udały się, bo wszystkie łagiewki pękały. Trzeba było zastosować dodanie obu barwników do pożywki i wtedy wybarwienia udawały się.

* Żelatynę dodawałem dla łatwiejszego utrzymania łagiewek przy przygotowaniu preparatów trwałych.

Barwiłem więc czerwienią obojętną w rozcieńczeniu 0,001% dodając barwnik wprost do pożywki. Najlepsze łagiewki, z komórkami generatywnymi płynącymi w nich, zwykle otrzymywałem po 5—6 godzinach przy temperaturze pokojowej ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). Najlepsze wybarwienie czerwienią obojętną otrzymałem po 8^h—12^h. Wakuole w łagiewce zabarwiły się na różowo, ale „ciałka żółte“ w końcach komórki generatywnej zabarwiły się na kolor czerwony. Miałem więc dowód, że należą one nie do klasy plastydów lub chondriosomów, ale do wakuoli. Poza tym takie mocne ich zabarwienie przypominało spostrzeżenie Guilliermonda i Gauthereta (1933), w którym oni stwierdzali, że zabarwienie wakuoli czerwienią obojętną na intensywny kolor czerwony „rouge framboise“, jak oni się wyrazili, jest reakcją na obecność oksyflawonów w tych wakuolach. To przypuszczenie popierała również ta okoliczność, że inne wakuole w łagiewce i w pyłkach barwiły się jak zwykle tylko na różowo. Wysiewając pyłki na pożywce: 15% sacharozy, 2% agaru, 2% żelatyny, 0,001% kwasu bornego, otrzymywałem zabarwienie wakuoli dużo mocniejsze niż na pożywce poprzedniej bez kwasu bornego, reakcja następowała prędzej, a kolor wakuolek w komórce generatywnej zmieniał się z żółtego na piękny czerwony, rzeczywiście przypominający kolor malinowy, zgodnie z określeniem Guilliermonda i Gauthereta.

Żeby skontrolować, że żółty barwik występuje w wakuolach, zastosowałem również barwienie przyżyciowe zielenią Janusową, w rozcieńczeniu 0,0001%, dodając ten barwik również bezpośrednio do pożywki. Z początku „żółte ciała“ na biegunach komórki generatywnej nie barwiły się wcale, chociaż w tym samym czasie chondriosomy w łagiewce i w pyłkach kielkujących zabarwiły się na kolor bladezielony. Jednak po pewnym czasie żółty kolor ustępował i przechodził na lekko różowy, mimo iż w tym samym czasie chondriosomy łagiewki wciąż jeszcze utrzymywały swój kolor lekko zielony. Taka reakcja wakuoli na zielenię Janusową, zdaniem Guilliermonda i Gauthereta (1946), też wskazuje na obecność oksyflawonów, chociaż nie jest na nie reakcją specyficzną.

Z reaktywem KJ+J „ciałka żółte“ w komórkach generatywnych koloru swego nie zmieniały. W tym samym preparacie reaktyw ten wybarwił bardzo intensywnie liczną skrobię w pyłkach oraz chondriosomy na ciemnożółty kolor na złocistym tle cytoplazmy. Użycie 1,25% AgNO_3 na świetle dziennym może być reaktywem na chloroplasty (Ruhland 1924). W wakuolach, w razie obecności związków flawonowych, reaktyw ten daje też wyraźny czarny kolor. W pewnych wypadkach w obecności tanin wywołuje on czarne strącenia. Tutaj jednak nigdy komórki generatywne nie wybarwiły się na czarno. Z rzadka niektóre wakuole generatywnej komórki zmieniały kolor żółty na brązowoczerwony. Uważałem

więc tę reakcję za negatywną na plastydy i obecność tanin i nijaką na flawony.

Przytoczone powyżej reakcje i barwienie przyżyciowe wykazały mi niewątpliwie, że żółte barwniki są umieszczone w wakuolach, a nie w chondriosomach lub plastydach. Poza tym reakcja z czerwienią obojętną wskazuje na obecność oksyflawonów w tych wakuolach i to samo, do pewnego stopnia, potwierdza słaboróżowa reakcja z zielenią Janusową.

Ze skąpej literatury, omawiającej występowanie flawonów i oksyflawonów w wakuolach, wynikała konieczność zachowania ostrożności, żeby ich nie mieszać z występującymi również substancjami taninowymi i fenolowymi. W tym celu zastosowałem następujące reakcje na łagiewki irysa:

1. 10% FeCl_3 z użyciem po nim węglanu sodu — z negatywnym rezultatem;
2. siarczan żelaza z następującym po nim działaniem formaliną (wg podręcznika Mac Clunga, 1929) — z negatywnym wynikiem;
3. błękit metylenowy w rozcieńczeniu 1 : 500.000 — rezultat nijaki, bo łagiewki pękały albo zamierały;
4. 1% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ z negatywnym rezultatem;
5. 1% osm. kw. — z rezultatem negatywnym, chociaż po dłuższym działaniu na świetle zjawiały się drobne szare i czarne ziarnistości w żółtych wakuolach komórek generatywnych.

Wszystkie powyższe reakcje na substancje taninowe i fenolowe dały wyniki negatywne.

Zastosowałem oprócz tego utrwalanie w płynie Regaud IV. Łagiewki utrwały się bardzo dobrze i na preparatach trwałych bez barwienia i bezpośrednio po utrwaleniu na preparatach w wodzie zamkniętych. Kształt komórki generatywnej był bardzo wyraźny, a drobne wakuole na obu spiczastych końcach komórki występowały jako zupełnie niezabarwione oczka w cytoplazmatycznej siateczce. Tym samym ten utrwalacz był reaktywnym na substancje taninowe i fenolowe, bo w ich obecności wakuole zabarwiłyby się na brązowo lub ciemnobrązowo. Łagiewki po powyższym utrwalaczu barwiły się dobrze żelazową hematoksyliną. I znowu teren wakuolek w komórce generatywnej był nie zabarwiony, chociaż w jej cytoplazmie i w łagiewce chondriosomy barwiły się na czarno.

Z powyższych reakcji, jak również z zastosowania utrwalacza Regaud IV, wynika jeszcze raz, że żółty barwnik mieści się w wakuolach i że nie zawierają one substancji taninowych i fenolowych.

Próbowałem również zastosować znane z literatury reakcje rozpuszczania na flawony i oksyflawony (Klein 1923), ale zawsze z wynikiem nijakim, bo łagiewki od razu pękały w zastosowanych typowych rozpusz-

czalnikach. Następnie stosowałem szereg reakcji na oksyflawony i flawony znanych z literatury. Ogromna większość z nich nie udawała się po prostu dlatego, że łagiewki w płynach pękały. Poniżej wymienię niektóre z moich prób:

Działanie 1% NH_4OH — łagiewki od razu pękają. Działanie 1% NH_4OH na łagiewki poprzednio utrwalone powoduje żółknięcie całej łagiewki. Jest to rezultat nijaki, bo wakuole w komórce generatywnej już za życia miały kolor żółty.

Po zastosowaniu innych słabych alkali (Guilliermond et Gautheret 1933), np. 1% NaOH , łagiewki również pękały. Opary stężonego NH_4OH niszczyły łagiewki zupełnie. Jedna z reakcji proponowanych przez Kleina, a mianowicie działanie stężonego HCl przy temp. 40°C , wzmacnia żółty kolor łagiewek, ale nie daje przewidzianych strąceń. Uważam to za wynik nijaki.

Z szeregu reakcji proponowanych przez Hurel-Py (1933) stosowałem: a. wodę destylowaną z acetonem; b. wodę destylowaną z gliceryną; c. wodę destylowaną czystą. Przy bardzo krótkim działaniu przewidywane sferokryształy nie tworzyły się, a przy trzymaniu przez czas przepisowy — łagiewki pękały. Uważam więc ten wynik za nijaki.

Reakcja R. Combessa z 1—0,5% octanem ołowiu (Guilliermond et Gautheret 1946), zastosowana na żywe łagiewki, wywoływała natychmiastowe pęknięcia łagiewek. Zastosowana na łagiewki utrwalone poprzednio 10% formaliną nie wywoływała powstania przewidzianych żółtych kryształów, a przy dłuższym trzymaniu następowało czasami wy-czernienie chromatyny jądra. Uważam ten rezultat za nijaki. Natomiast reakcja opisana przez Marini-Bettolo i Ballio (1946) dała wyraźnie pozytywny rezultat. Polega ona na użyciu SbCl_5 rozpuszczonego w bezwodnym CCl_4 , w stosunku 5—10 mg SbCl_5 na 5 cm^3 CCl_4 . Reaktyw ten użyty na żywe łagiewki powodował natychmiastowe ich zniszczenie. Dlatego musiałem używać łagiewek utrwalonych albo w 10% formalinie, albo w alkoholu absolutnym. Ale nawet w tych warunkach łagiewki nie wytrzymywały dłuższego działania tego odczynnika. Wybarwiły się natomiast bardzo wyraźnie wakuole w tych generatywnych komórkach, które nie zdążyły wyjść z pyłku do łagiewek. W tych warunkach wybarwiły się one na kolor czerwony, ale zbliżony do pomarańczowego lub brązowego. Otóż, zdaniem powyższych autorów, z SbCl_5 reagują: chalkony — dając kolor czerwony, flawony i flawonole — dając kolor pomarańczowy lub żółty. W komórce generatywnej irysa otrzymaliśmy kolor czerwony, ale raczej pośredni, bliższy do pomarańczowego. Zachodzi więc przypuszczenie — na podstawie tej reakcji — że barwniki obecne w wakuolach generatywnej komórki są albo flawonami, albo zawierają obok oksyflawonów również flawony.

Użycie tego odczynnika na żywe pyłki i łagiewki, jak już nadmienilem, nie dawało żadnego rezultatu, bo łagiewki niszczyły się. Spostrzegłem jednocześnie, że żółta substancja, pokrywająca zewnętrzne błony pyłkowe, barwi się od razu tym reaktywem na wyraźny kolor zielony. To bardzo wyraźne zabarwienie, przypominające kolor roztworów zieleni świetlnej, już po 2^h działania tego odczynnika stopniowo zanika.

Ostatni raz wróciłem do moich obserwacji nad żółtymi wakuolami w generatywnej komórce „hiszpańskiego“ żółtego irysa w 1951 roku. Wtedy także widziałem parę razy w łagiewkach spermy, tj. męskie komórki płciowe, również z żółtymi wakuolami na spiczastych końcach. Dwa razy udało mi się obserwować takie spermy z mocno na czerwono wybarwionymi wakuolami, po działaniu czerwieni obojętnej. W tym sezonie wysiałem również pyłek *Homeria pura* N. E. Br., rośliny z rodziny *Iridaceae*, o żółtych kwiatach, rosnącej dziko nad brzegami rzeki Vaal.

Tu również komórka generatywna w łagiewkach miała wyraźnie żółte wakuole. Część wyżej opisanych reakcji i przyżyciowych zabarwień powtórzyłem też na komórkach generatywnych *Homeria* z takim samym wynikiem.

Streszczając moje wyniki przyszedłem do przekonania, że: 1) nie miałem wyraźnie negatywnych reakcji na obecność oksyflawonów; 2) miałem trzy wyraźnie pozytywne wyniki, a mianowicie: a) otrzymanie koloru czerwono-malinowego z czerwienią obojętną, b) otrzymanie różowego zabarwienia po zieleni Janusowej, kiedy jednocześnie chondriosomy jeszcze były zielone, c) zabarwienie czerwone po $SbCl_5$ (reakcje Marini-Bettolo i Ballio).

Wobec tego, że w literaturze wciąż nie ma specyficznej i pewnej reakcji mikroskopowej na oksyflawony i flawony, uważam, iż przypuszczenie moje, że barwnik w wakuolach komórek generatywnych irysa „hiszpańskiego“ należy do oksyflawonów, a może nawet do flawonów, jest bardzo prawdopodobne.

W literaturze, o ile mi wiadomo, jest ogłoszona tylko jedna obserwacja K o s t r i u k o w e j (1939) o występowaniu, ale tylko zielonego barwnika, a nie żółtego, w komórce generatywnej u *Lilium Martagon*. Wobec tego postanowiłem to moje spostrzeżenie ogłosić, by zachęcić dalszych badaczy do zastosowania do tych obiektów więcej nowoczesnych metod badań, a zapewne szczególnie różniczkowej mikrospektrofotografii w świetle fioletowym i pozafioletowym. Już Shibata, Nagai i Kishida (1916) stwierdzali, że oksyflawony i flawony mocno pochłaniają fioletowe i pozafioletowe promienie i że służą roślinom w krajach o bardzo silnym nasłonecznieniu jako ochronne świetlne filtry.

Pozostaje jeszcze do omówienia sprawa niewystępowania żółtego barwnika w moich hodowlach łagiewek żółtego irysa w Warszawie, w latach

przed 1939 r. Naturalnie przede wszystkim może tu zachodzić nieidentyczność gatunku. To, że pewne irysy Ogrodu Botanicznego Uniwersytetu w Warszawie miały żółte kwiaty i że hodowcy nazwali je odmianą „Hiszpańską“, nie daje gwarancji, że one były tą samą odmianą, co hodowane w Johannesburgu, w Transwaalu, żółte irysy „Hiszpańskiej“ odmiany, wprowadzane z Holandii. Może tu zachodzić tylko prawdopodobieństwo tego samego gatunku, oparte raczej na tym, że i Ogród Botaniczny Warszawski też miał większość irysów z Holandii w tym czasie. O pochodzeniu „hiszpańskich“ irysów w Johannesburgu wiem od hodowców, według których są to mieszańce w różnych kombinacjach z *Iris Xyphium*. Jak wiadomo, istnieje oprócz tego gatunku cała sekcja „*Xyphia*“, irysów cebulkowatych (a nie kłęczastych jak nasze), o rozmieszczeniu w zachodniej części Śródziemnomorza (Engler u. Prantl 1930). Podobno, część tych „*Xyphia*“ krzyżowano z irysami płd.-afrykańskimi, a mieszańce nazwano „Irysami Hiszpańskimi“. Zupełnie jednak jest możliwe, że w hodowanych w Warszawie „hiszpańskich“ irysach, w warunkach łagodnego nasłonecznienia, oksyflawony i flawony w komórce generatywnej nie tworzą się, a powstają w tym samym gatunku hodowanym w warunkach nasłonecznienia Połudn.-Afryki jako ekran ochrony.

(Wpłynęło dn. 18.6.1958 r.)

Department of Botany
University of Witwatersrand
Johannesburg, U. S. Africa
oraz
Zakład Botaniki Ogólnej U. A. M.
w Poznaniu

SUMMARY

During his lectureship in 1946—1951 at Witwatersrand University, Johannesburg, Union of S.-Africa, the author found yellow pigment in vacuoles in pollen grain tubes of the yellow “spanish” *Iris* at both ends of generative cells.

Many reactions, recommended in papers by Guilliermond et Gautheret (1933a, b, 1946), Hurel-Py (1933), Klein (1923), Marini-Bettolo and Ballio (1946) for detection of oxyflavones and flavones were tried. None of them gave negative results. Many of the above reactions caused destruction of p. gr. tubes. All of them were inconclusive.

Only three reactions gave positive results. They were: 1) red. colour, so called “rouge framboise” of vacuoles in vivo with neutral-red., 2) pink colour of vacuoles with Janus green, 3) red, turning to orange-red, after treatment with SbCl_5 (after Marini).

Taking into consideration the lack of specific microscopic reactions in the literature for oxyflavones and flavones, the above mentioned results gave some reasonable grounds to take the yellow pigment in the vacuoles of generative cells for oxyflavones perhaps together with some flavones.

Many tests for the detection of tannins and phenolic substances were tried in the same vacuoles with negative results. The same yellow pigment in generative cells was found in 1951 in *Homeria pura*, some species of *Iridaceae*, indigenous for the Transvaal.

LITERATURA

- Engler und Prantl, 1930, Die natürliche Pflanzenfamilien (2 Edit., Vol. 15a: 504).
- Guilliermond A. et Gautheret R., 1933, Nouvelles remarques sur les caractères microchimiques des composées oxyflavoniques et les moyens de les distinguer de tanins, C. R. Soc. Biol. de France 112: 531.
- Guilliermond A. et Gautheret R., 1933, Caractères microchimiques des composées oxyflavoniques, leur localisation dans les vacuoles, Compt. R. d. l'Ac. Sci. 196: 369.
- Guilliermond A. et Gautheret R., 1946, Recherches sur la coloration vitale des cellules végétales, Rev. gén. de Bot. 53.
- Hurel-Py G., 1933, Sur un procédé d'obtenir la cristallisation des composées oxyflavoniques dans les vacuoles, Soc. Biol. d. France 112: 1191.
- Klein G., 1923, Der histochemische Nachweis der Flavone, Sitzungsberichte der Ak. d. Wiss. Wien. V. 131: 23.
- Kostiukova X. J., 1939, Observations in vivo on the formation of the male sex cells in *Lillium Martagon* L., Compt. Rend. de l'Acad. d. Sciences de l'URSS 22 (7): 444.
- Marini-Bettolo G. B. and Ballio A., 1946, Some colour reactions of flavone compounds. Gas. Chim. Ital. 76: 410—418 (Referat w Chemical Abstracts 1941, October 20th, p. 6565).
- Ruhland W. und Wetzel K., 1924, Der Nachweis von Chloroplasten in den generativen Zellen von Pollenschläuchen. Ber. d. Deutsch. bot. Gesell. 42: 3—14.
- Shibata K., Nagai I., Kishida M., 1916, The occurrence and physiological significance of flavone derivatives in plants. The Journal of Biol. Chemistry 28 (1).