Inkluzje tłuszczowe w chloroplastach

Inclusions lipidiques dans les chloroplastes

E. MIKULSKA

Występowanie kropli tłuszczowych w chloroplastach znane jest od dawna; obserwowali je Naegeli (1858), Meyer (1883) cyt. za Schimperem (1885), Schimper (1885), oraz pisali o nich: Guilliermond (1921), Guilliermond i Mangenot (1923) oraz Mangenot (1922). W latach późniejszych obecność inkluzji tłuszczowych w plastydach została stwierdzona przez Luksenburgową (1928), Faull (1935), Manuel (1936) oraz Caruso (1938, 1939).

U roślin jedno- i dwuliściennych kule tłuszczowe tkwią całkowicie wewnątrz stromy (Schimper 1885, Manuel 1936, Caruso 1939), u glonów znajdują się na powierzchni plastydów stykając się bezpośrednio z cytoplazmą (Schimper 1885, Li Koue-Tchang 1924, Olszewska, nie opubl.).

Granulacje tłuszczowe w plastydach mogą występować we wszystkich organach roślin: korzeniach, łodygach, liściach, częściach kwiatowych (Schimper 1885, Guilliermond 1921, Manuel 1936) oraz ziarnach pyłku (Luksenburgowa 1928).

Różni autorzy wyrażają odmienne poglądy na powstawanie i rolę tłuszczów w plastydach. Schimper (1885) i Guilliermond (1933) stoją na stanowisku, że pojawianie się tłuszczów w plastydach jest wynikiem degeneracji tych ostatnich. W miarę starzenia się komórek ilość inkluzji zwiększa się, stroma natomiast ulega stopniowej redukcji. Tłuszcze te nie są więc zużywane przez roślinę. Holle (1877) uważa krople tłuszczu w chloroplastach za produkt syntezy. Buscaloni (1912, cyt. za Manuel 1936) przypuszcza, że są one produktem fotosyntezy w wypadku, gdy nie tworzy się skrobia, oraz że mają one znaczenie w procesach oddychania i utleniania. Luksenburgowa (1928) traktuje kuleczki

występujące w leukoplastach ziaren pyłkowych jako substancje zapasowe. Według Beauverie'go (1928) chloroplasty w różnych fazach rozwoju mogą produkować przejściowo tłuszcze. Tłuszcze te bywają bądź zresorbowane w ciełe macierzystym, bądź są wydzielane do cytoplazmy. Zdaniem tego autora w plastydach mogą powstawać obficie substancje tłuszczowe pod wpływem inwazji pasożyta — jako zjawisko patologiczne.

Badania cytochemiczne wykazały, że inkluzje tłuszczowe w chloroplastach utworzone są z tłuszczu obojętnego zmieszanego z pewną ilością fosfolipidów (Mangenot 1922), bądź tylko z fosfolipidów (Mangenot i Guilliermond 1923), mogą też zawierać ergosterole połączone z kwasem tłuszczowym (Manuel 1936), lub same kwasy tłuszczowe (Guilliermond 1921). A. Meyer (1920 cyt. za Manuel 1936) wyraża całkiem inny pogląd na budowę chemiczną tych inkluzji plastydowych. Wg niego tworzące się w chloroplastach granulacje, przypominające wyglądem tłuszcze, nie są utworzone przez lipidy, lecz odpowiadają aldehydowi heksenowemu, który został znaleziony w produktach destylacji liści. Tego typu ziarnistości spotyka się, zdaniem tego autora, wyłącznie w chloroplastach; tworzą się tylko na świetle jako produkt uboczny fotosyntezy. Nazywa je „Auto-Plastensekret“. Późniejsze badania Guilliermonda i Mangenota (1923) wykazały jednak, że wspomniane granulacje zjawiają się nie tylko w chloroplastach, lecz i w leukoplastach; posiadają wszystkie cechy tłuszczów. Guilliermond uważa je za fosfolipidy (dają pozytywną reakcję Dietricha), które zjawiają się w wyniku uwalniania tłuszczów konstytucyjnych pod wpływem nieznanych jeszcze czynników w pewnych fazach rozwojowych plastydów (lipofaneroza). Do podobnych wniosków dochodzi Faull (1935) badając u *Iris* leukoplasty produkujące tłuszcze.

Ostatnie badania cytochemiczne Olszewskiej (nie opubl.) nad *Spirogyra* pozwoliły stwierdzić, że inkluzje tłuszczowe występujące w chromatoforze zbudowane są z części centralnej złożonej z tłuszczów obojętnych oraz z otoczki zawierającej prawdopodobnie mieszaninę tłuszczów złożonych, wśród których obecne są fosfolipidy.

MATERIAŁ I METODY

Występowanie inkluzji tłuszczowych w chloroplastach badano bądź w czasie całego rozwoju plastydów, bądź tylko w plastydach wyróżnianych. Obserwacje prowadzono w ciągu całego roku. Materiał u *Amaryllis belladonna* L., *Clivia miniata* Rgl. i *Iris germanica* L. stanowiły liście różnego wieku, przy czym badano każdy liść w kilku strefach, w zależności od stopnia zazielenienia, natomiast u *Aloe arborescens* Mill.

Aloe aristata Haw., *Vriesea carinata* Wawra, *Sansevieria* Willd., *Ophiopogon japonicus* Ker., *Haemanthus Katherinae* Bak., *Hedera helix* L., *Vinca minor* L. i *Buxus sempervirens* L. brano pod uwagę tylko liście będące w pełni rozwoju. Rośliny *Iris germanica* zostały przeniesione w październiku z ogrodu do szklarni, w której przebywały i rozwijały się bez okresu spoczynku do końca marca; w kwietniu zostały ponownie wysadzone do gruntu. Liście *Vinca minor* oraz *Buxus sempervirens* pochodziły z okazów rosnących wyłącznie w gruncie, liście *Hedera helix* pochodziły z okazów rosnących w ogrodzie i w szklarni. Pozostałe rośliny przebywały stale w szklarni. Średnia temperatura w szklarni w miesiącach zimowych wahała się od 13° do 15°C.

Badania przeprowadzano na materiale żywym i utrwalonym. Żywe komórki oglądano na skrawkach sporządzonych ręcznie z dolnej strony liści, równoległe do powierzchni. Skrawki umieszczano bądź w płynie Ringera, bądź w wodzie wodociągowej, bądź w oleju parafinowym. Podobnie przygotowane preparaty utrwalano w 3% dwuchromianie potasu, w płynie Regaud, w parach 2% kwasu osmowego, w 1% lub 2% kwasie osmowym, w formalinie zbuforowanej wg przepisu R. D. Lilliego (1954) oraz w utrwalaczu formalinowo-wapniowym Bakera.

Celem ustalenia charakteru tłuszczu stanowiącego inkluzje w chloroplastach przeprowadzano reakcje mikrochemiczne przy pomocy następujących odczynników: Sudan III i IV oraz ich mieszanina (rozpuszczalnik aceton i 70% alkohol), Sudan IV wg Bojarkina (Świeszniakowa 1956), Sudan czarny B (szczególnie zalecany przez Lisona 1934), 1% błękit Nilu, błękit indofenolowy (reakcja „Nadi”), kwas osmowy, kwaśna hemateina Bakera. Posługiwano się metodą Fischlera na kwasy tłuszczowe i metodą opracowaną przez Baroliera i Suchowsky'ego na kwasy tłuszczowe nienasycone, metodą Feyrtera na fosfatydy i cerebrozydy, oraz metodą Schultza dla wykrycia cholesterolu. Stosowano również reakcję z kwasem nadmśrówkowym i odczynnikami Schiffa na lipidy nienasycone (Pearse 1957). Do tej reakcji używano kwasu nadoctowego, a nie nadmśrówkowego, ponieważ ten ostatni niszczył plastydy. Przeprowadzano również reakcję z digitoniną (Reilhes 1936) oraz zmydlanie wg Molischa (1921).

Do ekstrakcji tłuszczów używano pirydyny, alkoholu 70% i abs. eteru i acetonu. Dla wykrycia skrobi stosowano wodny roztwór JKJ, dla wykrycia białka w inkluzjach tłuszczowych — reakcję z bromofenolem wg Mazia, Brewera i Alferta (1953).

Posługiwano się mikroskopem „Lumipan“ Zeissa. Korzystano z urządzenia polaryzacyjnego oraz z mikroskopu fluorescencyjnego. Rysunki wykonano przy pomocy aparatu rysunkowego Abbe'go.

BADANIA WŁASNE

Iris germanica L.

Badano liście młode długości 5—15 cm, i liście wyrosnięte. Skrawki sporządzano na całej długości liścia w odstępach od jednego do kilku centymetrów. Na ryc. 1. przedstawione są kolejne stadia rozwoju chloroplastów w liściach różnego wieku.

W skrawkach pochodzących z podstawy liścia, która miała barwę białą, występują bardzo drobne bezbarwne proplastydy. Są one wydłużone, przecinkowate, z jednego końca zaokrąglone (ryc. 1, I A, II A, III A). W części

Ryc. 1. *Iris germanica*. Kolejne stadia rozwoju inkluzji tłuszczowych i ziaren skrobi w chloroplastach 3 liści różnego wieku; a — skrobia; b — tłuszcz. A — biała strefa liści; B — jasnoseledynowa; C — seledynowa, D — jasnozielona; E — zielona

szerszej występuje zawsze jedno ziarenko skrobi barwiące się JwKJ fioletowoczerwono. W strefie wyższej liścia, o słabo zielonym zabarwieniu, plastydy są nieco większe z większymi, pojedynczymi ziarnami skrobi, tkwiącymi tylko podstawą w stromie (ryc. 1, I B, II B, III B). W części plastydu wolnej od skrobi, wykazującej bardzo słabe, homogenne, seledynowe zabarwienie, pojawia się tłuszcz jako duża, pojedyncza kula, zajmująca całe wnętrze plastydu. Błękit Nilu barwi tę inkluzję tłuszczową na kolor różowoczerwony.

W następnej strefie liścia (ryc. 1, I C, II C, D) plastydy są znacznie większe oraz intensywniej zabarwione na zielono. Tutaj spotyka się największą ilość dzielących się plastydów. Ziarna skrobi są mniejsze w stosunku do całego plastydu, kule tłuszczowe występują nadal. Strefa dalsza (ryc. 1, I D) wykazuje zróżnicowane już chloroplasty z dużą ilością gran. Nieliczne chloroplasty zawierają jeszcze ziarna skrobi. W przeważającej ilości plastydów, w części środkowej, tkwią duże, najczęściej pojedyncze kule tłuszczu. Dojrzałe plastydy nie wykazują zupełnie obecności skrobi, a tylko ogromne, pojedyncze krople tłuszczu (ryc. 1, I E, II E, ryc. 2 C), często inkluzje te przybierają kontury wieloboczne i podobne są do kryształów białkowych. Zwykle robią wrażenie ciała stałego. Najwięcej plastydów zawierających duże kule tłuszczowe występuje w okolicy wiązek przewodzących. Należy zaznaczyć, że w liściach wyrosniętych, w komórkach zupełnie zróżnicowanych dość częste też były plastydy zawierające po kilka kul tłuszczu, które znajdowały się tuż pod powierzchnią plastydu. Spotyka się również nieliczne plastydy pozbawione tłuszczu. W okresach kiedy wiosną temperatura obniżała się, ilość plastydów nie zawierających tłuszczu bardzo malała. Przed kwitnięciem tylko nieliczne plastydy zawierały w środku pojedyncze, duże kule tłuszczu. Inne miały małe kule tłuszczu tkwiące na obwodzie. Czasami też wyglądało tak, jak gdyby plastydy na pewnym tylko odcinku od zewnątrz były oblane warstwą tłuszczu, nigdy jednak nie stwierdzono w nich obecności skrobi. Dłuższe zaciemnianie całej rośliny (2 tygodnie) powodowało rozpadanie się dużych kul tłuszczu na drobne i liczne kuleczki znajdujące się w tym samym miejscu, gdzie występowała poprzednio duża kula tłuszczu.

Charakter tłuszczów występujących w chloroplastach liścia *Iris germanica*

Rozpuszczalność. Jako rozpuszczalniki stosowano alkohol, aceton, eter oraz pirydynę. Alkohol wyższych koncentracji, począwszy od 40°, rozpuszcza kule tłuszczowe w chloroplastach w ciągu kilkunastu sekund. Eter, pirydyna i aceton powodują również szybkie rozpuszczenie

tluszczów już w temperaturze pokojowej. Morfologia dojrzałych plastydów, z których usunięto tłuszcze acetonem, eterem lub pirydyną, jest taka sama jak przed ekstrakcją. Wewnątrz znajduje się ciało, które kształtem przypomina inkluzję tłuszczową, jednak barwienie Sudanem czarnym B nie wykazuje tłuszczu. Jak wykazały dalsze badania, jest to białko, które występuje w postaci otoczki dokoła kuli tłuszczowej. Otoczek takich nie ma w plastydach młodych.

Badania w świetle spolaryzowanym. Kule tłuszczu przy skrzyżowanych nikolach zachowują się jak ciała izotropowe. Wiadomo (Pearse 1957), że jest to charakterystyczne dla tłuszczu obojętnych i kwasów tłuszczowych w stanie płynnym.

Reakcje cytochemiczne

Kwas osmowy nadaje kulom tłuszczowym w plastydach żółto-brunatny kolor. Próba „wtórnego czernienia“ (zastosowanie alkoholu po kwasie osmowym) dała wynik negatywny świadczący o braku lecytyn (Pearse 1957).

Sudan III i IV. Na bardzo duże trudności natrafiono stosując barwienie Sudanem III oraz IV na materiale świeżym, ponieważ alkoholowe roztwory rozpuszczały tłuszcze (p. wyżej rozpuszczalność). Mieszanina Sudanu III i IV w alkoholu i acetonie również nie dawała rezultatów pozytywnych z powodu wypłukiwania substancji tłuszczowych przez rozpuszczalniki. Próbowano stosować roztwór Sudanu IV wg przepisu Kay i Whitcheada 1934 (cyt. za Pearsem 1957). Roztwór Sudanu IV w alkoholu absolutnym rozcieńczano do 6‰ wodą tuż przed użyciem. Jednak zadowalających wyników nie otrzymano. Niepowodzeniem zakończyło się także stosowanie metody żelatynowo-sudanowej (wg Gowana 1944 cyt. wg Pearsa 1957). Próbowano przed barwieniem Sudanem II i IV utrwalać materiał w 3‰ dwuchromianie potasu lub w płynie Regaud, które wg Reilhaesa (1936) zachowują tłuszcze bardzo dobrze. Jednak metoda ta ma swoje braki. Po utrwaleniu kule tłuszczu przybierają zabarwienie ciemnożółte, co utrudnia skonstatowanie barwienia Sudanem, które również często ma odcień pomarańczowy (szczególnie po metodzie Gowana).

Sudan czarny B w 70‰ alkoholu na materiale utrwalonym formaliną lub płynem formalinowo-wapniowym Bakera dawał granatowo-czarne zabarwienie kul tłuszczu w chloroplastach. Utrwalenie jednak powodowało rozpuszczenie części tłuszczu: kule tłuszczowe były mniejsze niż inkluzje na materiale żywym. Najlepsze wyniki dawało utrwalaanie skraw-

ków w ciągu 10—15 minut w 1% lub 2% kwasie osmowym, a następnie barwienie Sudanem czarnym B. Zbędne było odbarwianie, ponieważ kwas osmowy nie wyczerniał kul tłuszczowych.

Błękit Nilu. Przed barwieniem materiał utrwalano w utrwalaczu formalinowo-wapniowym Bakera. Barwienie dało wyniki dodatnie. Tłuszcz występujący w proplastydach i w nieco późniejszych stadiach rozwoju plastydów barwił się wyraźnie na kolor jasno lub ciemnoróżowy. Lepsze znacznie rezultaty otrzymano na materiale nie utrwalonym, działając na skrawki błękitem Nilu przez 30 min. w temp. pokojowej. W plastydach już zróżnicowanych kule tłuszczu barwiły się intensywnie — bądź na kolor różowy, bądź na niebieski, co wskazuje, że nie zawsze tłuszcze te mają charakter tłuszczów obojętnych. Liście w miarę swego rozwoju zawierały coraz mniejszą ilość plastydów, których inkluzje barwiły się błękitem Nilu, mimo iż nie różniły się one morfologicznie od kul tłuszczowych znajdujących się w młodszych liściach. Wskazuje to, iż w miarę rozwoju liści, w inkluzjach zachodzą przemiany chemiczne. Skrawki poddane reakcji na białko błękitem bromofenolowym wykazały (jedynie po ekstrakcji pirydyną) bardzo ładne i wyraźne zabarwienie na obwodzie inkluzji. Z powyższego wynika, że w plastydach w części zewnętrznej skupiają się białka, które maskując tłuszcze utrudniają reakcję z błękitem Nilu.

Metoda Fischlera wykrywania kwasów tłuszczowych. Metodę tę zastosowano dla potwierdzenia, że ciała barwiące się błękitem Nilu na niebiesko istotnie zawierają kwasy tłuszczowe. Otrzymano reakcję pozytywną, która nie występowała w skrawkach kontrolnych uprzednio ekstrahowanych przez 24 godziny trzema zmianami mieszaniny alkoholu z eterem w równych częściach.

Metoda Baroliera i Suchowsky'ego wykrywania kwasów tłuszczowych nienasyconych. Stosując tę metodę otrzymano czarne zabarwienie ciał znajdujących się w plastydach. Prawdopodobnie w trakcie stosowania tej reakcji pojedyncze kule tłuszczowe rozpadały się na mniejsze barwiące się czarno. Wyniki i tej reakcji można więc uważać za dodatnie.

Reakcja „Nadi”. Kule tłuszczowe w plastydach zabarwiały się bardzo wyraźnie na kolor fioletowy. Na ogół uważa się, że produkt reakcji powinien mieć zabarwienie niebieskie, jednak wielu badaczy — Z w e i b a u m i M a n g e n o t (1923), B u v a t (1936) — otrzymało w materiale roślinnym fioletowe zabarwienie tłuszczu.

Z mydlenie wg M o l i s c h a (1921) — wykazywało obecność kryształów mydła wyraźnie świecących w świetle spolaryzowanym.

Kilkakrotne stosowanie metody Feyrtera na cerebrozydy i fosfatydy, metody Schultza na cholesterole oraz posługiwanie się reakcją z kwasem nadoctowym i odczynnikiem Schiffa na lipidy nienasycone (Pearse 1957), reakcją z digitaniną na sterole (Reilhes 1936, Buvat 1936) i kwaśną hemateiną Bakera na fosfolipidy dawało zawsze wynik negatywny.

Przemiana tłuszczów w chloroplastach liści

Pojedyncze kule tłuszczowe tworzyły się w najwcześniejszych stadiach rozwojowych chloroplastów obok skrobi. Już proplastydy zawierały duże kule tłuszczu obojętnego, pozbawione otoczki białkowej. We wczesnych stadiach rozwojowych różnicowania się chloroplastów skrobia zanikała całkowicie. W kulach tłuszczowych niektórych starszych plastydów ukazywały się kwasy tłuszczowe, w innych nadal były wyłącznie tłuszcze

Ryc. 2. Chloroplasty z widocznymi inkluzjami tłuszczowymi w liściach: A — *Amaranthus belladonna*; B — *Clivia miniata*; C — *Iris germanica*

obojętne. Jak podano wyżej, w miarę rozwoju liścia, w inkluzjach kulistych plastydów ujawniały się przejściowo białka, które występowały w częściach obwodowych.

W okresie kwitnienia rośliny zmniejszała się wyraźnie ilość tłuszczu w chloroplastach. Kule tłuszczu były znacznie mniejsze niż poprzednio, nie występowały już w środku plastydu, lecz tkwiły na obwodzie. Wyglądem przypominały ziarna skrobi, nie barwiły się jednak w JKJ, zaś Sudan czarny B barwił je na czarno na materiale utrwalonym. W miesiącu czerwcu tylko nieliczne chloroplasty zawierały inkluzje tłuszczowe, we wrześniu nie zauważono chloroplastów z inkluzjami tłuszczowymi tak charakterystycznymi w innych porach roku.

Clivia miniata R g l.

Badano występowanie kropli tłuszczowych w chloroplastach mezofilu w trakcie ich rozwoju. Zbadano liście bardzo młode, zupełnie bezbarwne, długości około 0,5 cm — 1,5 cm; liście młode długości 10—17 cm oraz liście wyrosnięte długości 35—45 cm. Skrawki sporządzano co kilka cm w zależności od zmiany intensywności zabarwienia liści. Najpierw badano strefę bezbarwną, potem kolejne strefy zazieleniania się liścia.

W liściach długości 0,5—1,5 cm komórki zawierają proplastydy. Są one bezbarwne, nie wykazują fluorescencji w mikroskopie fluorescencyjnym. Skrobia wypełnia całe wnętrze plastydu, stroma występuje w formie delikatnej warstewki zewnętrznej. Już w tym stadium pojawiają się nieliczne kuleczki tłuszczu (ryc. 3, III b).

W liściu długości około 17 cm można było wyróżnić kolejne stadia rozwoju plastydów, którym towarzyszyły odpowiednie przemiany znajdujących się w nich substancji. Komórki zupełnie bezbarwnej podstawy liścia posiadają drobne proplastydy różnych kształtów zdolne do ciągłej zmiany form. Mogą one być wydłużone, przecinkowate, owalne, w jednym końcu rozszerzone, w drugim zaostrzone (ryc. 3, II 1). Stroma jest całkowicie bezbarwna, wewnątrz występują drobne ziarna skrobi. Skrobia ta na pierwszy rzut oka robi wrażenie pierwotnego granum, jednak w JKJ barwi się wyraźnie na fioletowo. W strefie leżącej 2 cm powyżej poprzedniej (ryc. 3, II 2) jeszcze prawie bezbarwnej, stroma plastydów wykazuje bardzo jasne zielonkawożółtawe homogenne zabarwienie. Plastydy te fluoreszczą na kolor jasnoczerwony w mikroskopie fluorescencyjnym i dają pozytywną reakcję z AgNO_3 , co świadczy o obecności chlorofilu. Wewnątrz występują ziarna skrobi, pojawiają się również kuleczki tłuszczowe. O 2 cm wyżej od tego miejsca (ryc. 3, II 3). Liść wykazuje jasnoseledyno-

we zabarwienie. Plastydy są znacznie większe, przybierają regularną kulistą lub owalną formę. W głębi lub też pod powierzchnią stromy występują ziarna skrobi oraz kropelki tłuszczu. W strefie tej plastydy wykazują intensywniejsze zielone zabarwienie. Ze względu na wypełnienie wnętrza plastydu drobnymi ziarnami skrobi i kuleczkami tłuszczowymi, trudno tu mówić o zróżnicowaniu na stromę i grana. W wyraźnie zielonej części liścia, leżącej 4 cm powyżej poprzedniej, znajdują się plastydy osta-

Ryc. 3. *Clivia miniata*. Kolejne stadia rozwoju inkluzji tłuszczowych i skrobi w czasie rozwoju chloroplastów w liściach różnego wieku: a — ziarna skrobi; b — kule tłuszczu. A — strefa biała liścia; B — strefa seledynowa; C — strefa jasnozielona; D — strefa zielona. Cyfry arabskie oznaczają strefy zbadane

tecnie zróżnicowane, zawierające już liczne zielone grana. Stroma w niektórych chloroplastach sprawia wrażenie zielonej. W plastydach tych brak jest skrobi, występuje natomiast obficie tłuszcz w postaci licznych

Ryc. 4. *Clivia miniata*. Kolejne stadia rozwoju chloroplastów w liściu rośliny kwitnącej; a — skrobia; b — kule tłuszczu. A — strefa biała liścia; B — seledynowa; C — jasnozielona; D — zielona

kul różnej wielkości znajdujących się wewnątrz plastydów. (ryc. 3, II 4). W strefach następnych (ryc. 3, II 5, 6) wskutek dużej zawartości tłuszczu plastydy tracą kuliste lub owalne kontury przybierając kształty nieregularne, tłuszcz występuje nie tylko w środku, ale i na obwodzie plastydu. Grana często mają układ nieregularny, gdyż zostały rozsunięte przez gromadzące się tłuszcze. Niektóre plastydy są otoczone delikatną warstwą substancji tłuszczowej, która maskuje grana tak, iż plastydy te robią wrażenie prawie homogenicznie zielonych (ryc. 2 B). W liściach dużych ostatecznie rozwiniętych kolejność pojawiania się skrobi i inkluzji tłuszczowych jest taka sama, tylko plastydy są większe i posiadają więcej substancji zapasowej (ryc. 3 I).

Na podstawie licznych obserwacji przeprowadzonych na liściach różnego wieku można było stwierdzić, że strefa występowania skrobi w plastydach mezofilu kończy się w miejscu, w którym liść wykazuje bladzielone zabarwienie. Jest to strefa bardzo krótka, obejmująca plastydy bardzo młode, jeszcze niewykształcone ostatecznie. Tłuszcz pojawia się bardzo wcześnie, już w tym okresie, kiedy plastydy są proplastydami i występuje jako stały składnik w ciągu całego rozwoju i wegetacji rośliny. Sytuacja ta zmienia się jednak w okresie kwitnienia. W plastydach na całej długości liścia pojawiają się ziarna skrobi, których nigdy nie obserwowano w innych okresach życia rośliny (ryc. 4 a). Zmniejsza się natomiast wyraźnie ilość tłuszczu w chloroplastach. Po przekwitnięciu znów skrobia zanika. W chloroplastach zwiększa się ilość tłuszczów. Zachodzi tu prawdopodobnie odwracalny proces przemiany tłuszczów w węglowodany. Występowanie skrobi teraz jest znów ograniczone wyłącznie do strefy u podstawy liści, o której wspomniano wyżej. Ziarna skrobi pojawiające się na miejsce tłuszczu są umiejscowione w sposób identyczny jak tkwiące tam poprzednio kule tłuszczu. Udało się zauważyć w skrawkach podłużnych, że w rzędzie komórek leżących jedna nad drugą, jedne zawierają plastydy z tłuszczem, inne już z identycznie położonymi ziarnami skrobi.

Przemiany inkluzji tłuszczowych w chloroplastach liści *Clivia miniata*

Przeprowadzone reakcje cytochemiczne pozwalają stwierdzić, że w chloroplastach liści *Clivia miniata* znajdują się kule tłuszczowe. Tłuszcz pojawia się bardzo wcześnie, w okresie kiedy plastydy znajdują się jeszcze w stadium proplastydów. W stadium tym obok tłuszczów występuje skrobia. Potem w trakcie dalszego rozwoju plastydów skrobia zanika całkowicie, wzrasta natomiast wyraźnie ilość tłuszczu. Tłuszcz ten wystę-

puje w ciągu całego okresu rozwoju rośliny. W okresie kwitnienia rośliny w chloroplastach, obok zmniejszonej ilości tłuszczu, pojawiają się powtórnie ziarna skrobi, zanikające po jej przekwitnięciu. Próby ustalenia charakteru chemicznego tych tłuszczów wykazały, że są to mieszaniny, których skład zmienia się często, zależnie od wieku rośliny lub od warunków, w jakich roślina przebywa.

W proplastydach pojawiają się tylko tłuszcze obojętne. W plastydach starszych, w miarę zanikania skrobi, pojawiają się obok istniejących

Ryc. 5. *Amaryllis belladonna*. Kolejne stadia rozwoju inkluzji tłuszczowych i skrobi w czasie rozwoju chloroplastów liścia; a — ziarna skrobi; b — kule tłuszczu: 1 — strefa biała liścia; 2 — strefa seledynowa; 3 — strefa jasnozielona; 4 — strefa zielona. Litery A, B, C, D, E, F — oznaczają miejsca zbadane

tluszczów obojętnych — kwasy tłuszczowe i fosfolipidy. W chloroplastach roślin zaciemnianych przez dłuższy okres czasu (1—2 tyg.) — udaje się wykazać jedynie obecność tłuszczów obojętnych.

Amaryllis belladonna L.

Badano liście roślin wieloletnich oraz liście roślin wyhodowanych z nasienia, 1- i 2-letnie. Żadnych różnic w chloroplastach roślin młodych i wieloletnich nie zauważono. Rozwój plastydów i pojawianie się w nich skrobi i tłuszczów przedstawione są na ryc. 5.

W bezbarwnych lub homogenicznie zazielenionych proplastydach występuje jedna lub kilka ziaren skrobi (ryc. 5, A). W proplastydach nieco starszych obok skrobi zaczynają pojawiać się kuleczki tłuszczu (ryc. 5, B). W miarę dalszego rozwoju plastydu skrobia zanika całkowicie, a miejsce jej zajmują mniejsze lub większe kule tłuszczowe (ryc. 5, D, E, F, ryc. 2, A). Proces rozwoju chloroplastów oraz pojawianie się w nich substancji zapasowych — są takie same, jak w chloroplastach liści *Clivia miniata*.

Zastosowanie reakcji cytochemicznych, jakimi posługiwano się przy badaniach chloroplastów liści *Clivia*, doprowadziło do następujących wyników. Inkluzje tłuszczowe pojawiające się w proplastydach należą do tłuszczów obojętnych. W plastydach zróżnicowanych obok tłuszczów obojętnych pojawiają się kwasy tłuszczowe i fosfolipidy.

Aloe arborescens Mill., *Aloe aristata* Haw., *Vriesea carinata* Wawra, *Sansevieria* Willd., *Ophiopogon japonicus* Ker., *Haemanthus Katherinae* Bak., *Dracaena fragrans* Gawl.

Wszystkie wymienione rośliny wykazywały w miesiącach zimowych w chloroplastach obecność kul tłuszczowych. Barwienie Sudanem czarnym B, mieszaniną Sudanu III i IV, błękitem Nilu, zastosowanie metody Fischlera na kwasy tłuszczowe — dały wyniki pozytywne. W miesiącach zimowych u *Aloe arborescens*, *Aloe aristata*, *Vriesea* oraz *Dracaena* obok tłuszczu występowały również nieliczne ziarna skrobi (ryc. 6). Badania przeprowadzone w maju i czerwcu pozwoliły stwierdzić obecność tłuszczu w chloroplastach liści *Ophiopogon japonicus*. W plastydach tych obok tłuszczu występują również ziarna skrobi, których nie wykryto zimą (ryc. 7). W chloroplastach liści *Aloe arborescens* i *A. aristata* znacznie wzrosła ilość skrobi, natomiast inkluzje tłuszczowe znikły całkowicie. Chloroplasty liści *Vriesea carinata* zachowują się podobnie jak chloroplasty liści *Ophiopogon japonicus*. W miesiącach zimowych obok nielicznych bardzo ziaren skrobi plastydy zawierały liczne i duże kule tłuszczu w formie dużych skupień (ryc. 6, D). W miesiącach letnich w plastydach

bardzo wzrosła ilość skrobi, zmalała natomiast znacznie ilość tłuszczów (ryc. 8). Występują one w formie małych i nielicznych kropelek znajdujących się blisko powierzchni plastydu. Chloroplasty *Sansevieria* w mie-

Ryc. 6. Chloroplasty liści zebranych zimą; A — *Aloe arborescens*; B — *Aloe aristata*, C — *Dracaena fragrans*; D — *Vriesea carinata* z ziarnami skrobi (a), i kuleczkami tłuszczu (b). Preparat barwiony Sudanem czarnym B.

siącach letnich nie wykazywały ani inkluzji tłuszczowych, ani skrobi. W zróżnicowanych chloroplastach dojrzałych liści *Haemanthus Katherinae* w miesiącach zimowych były liczne kule tłuszczu obojętnego. W miesiącach wiosennych w liściach młodych tłuszczów nie znaleziono, zaczynają się one pojawiać pod koniec czerwca w formie nielicznych początkowo i drobnych kuleczek.

Ryc. 7

Ryc. 7. *Ophiopogon japonicus*. A — chloroplasty z inkluzjami tłuszczowymi (b) w okresie zimy; B — chloroplasty z ziarnami skrobi (a) i kuleczkami tłuszczu (b) w okresie lata

Ryc. 8

Ryc. 8. *Vriesea carinata*. Chloroplasty liści zebranych latem z licznymi ziarnami skrobi (a) i nielicznymi kuleczkami tłuszczu (b)

Hedera helix L., *Vinca minor* L., *Buxus sempervirens* L.

Chloroplasty roślin zimozielonych zostały zbadane z punktu widzenia występowania w nich substancji zapasowych, zależnie od pory roku. W chloroplastach liści *Hedera helix* rosnącej w ogrodzie występowały liczne kule tłuszczu obojętnego i kwasów tłuszczowych (ryc. 9, A 1) w miesiącach zimowych (grudzień, styczeń, luty, początek marca). Kule tłuszczowe znajdujące się w tych chloroplastach barwiły się błękitem Nilu, Sudanem III i IV oraz Sudanem czarnym B, a także dawały reakcję na kwasy tłuszczowe (metoda Fischlera). Skrobi natomiast, tak obficie występującej w pozostałych porach roku, w tym okresie nie wykryto. W połowie marca ilość tłuszczów zaczęła maleć, pojawiły się natomiast nieliczne ziarna skrobi (ryc. 9, A 2). W końcu marca tłuszcze znikły całkowicie, chloroplasty wypełniły się licznymi i dużymi ziarnami skrobi (ryc. 9, A 3). Takie same zmiany substancji zapasowych zachodziły w chloroplastach dolnej skórki liści *Hedera helix* (ryc. 10).

Podobne zjawiska zaobserwowano w chloroplastach *Hedera helix* rosnącej stale w szklarni. W chloroplastach tych w miesiącach zimowych również występował tłuszcz, tylko w mniejszych ilościach (ryc. 9, B). W przeciwieństwie do *Hedera* rosnącej w ogrodzie, nie wykryto tu kwasów tłuszczowych. Pod koniec marca w chloroplastach *Hedera* rosnącej w szklarni, zaczęły się pojawiać nieliczne i małe ziarna skrobi obok istniejącego jeszcze tłuszczu (ryc. 9, B 2). W okresie późniejszym kuleczki tłuszczowe znikły całkowicie, natomiast pojawiły się bardzo liczne i bar-

Ryc. 9. *Hedera Helix*. A — rosnąca w gruncie; B — hodowana w szklarni. 1 — chloroplasty z inkluzjami tłuszczowymi (b) zimą; 2 — chloroplasty z inkluzjami tłuszczowymi (b) i ziarnami skrobi (a) w marcu; 3 — chloroplasty wypełnione ziarnami skrobi (a) latem

dzo duże ziarna skrobi (ryc. 9, B 3). Skrobia ta w materiale szklarniowym i ogrodowym występuje w chloroplastach mniej więcej do listopada, potem jej miejsce zaczyna zajmować tłuszcz.

Chloroplasty *Hedera* szklarniowej i ogrodowej, zawierające inkluzje tłuszczowe, nie traciły zdolności tworzenia skrobi w warunkach eksperymentalnych w okresie zimy. W skrawkach umieszczonych w 20% roztworze glukozy po paru godzinach w chloroplastach można było wykryć liczne i duże ziarna skrobi.

Barwienie błękitem Nilu, Sudanem czarnym B, mieszaniną Sudanu III i IV wykazały obecność kropelek tłuszczu w chloroplastach skórki i mezofilu liści *Vinca minor*. Były to tłuszcze obojętne, jak wykazał błękit Nilu.

Stosowanie metody Fischlera nie wykazało obecności kwasów tłuszczowych w inkluzjach plastydowych.

W miesiącu marcu w chloroplastach zaczęła pojawiać się skrobia. Tłuszcz natomiast występował w nieznacznej ilości i nie we wszystkich chloroplastach. Reakcje cytochemiczne przeprowadzone w maju wykazały całkowity brak inkluzji tłuszczowych w chloroplastach, które zawierały wyłącznie skrobię.

Chloroplasty mezofilu *Buxus sempervirens*, jak to stwierdzono już wcześniej (Mikulska 1957), w miesiącach zimowych nie posiadają skrobi, natomiast Sudan czarny B i błękit Nilu wykazuje w nich obecność kul tłuszczowych. Tłuszcz ten występuje w nieznacznych ilościach. W pozostałych porach roku, tak jak w innych zimozielonych roślinach, w chloroplastach jest dużo skrobi.

Ryc. 10. *Hedera helix*. Chloroplasty dolnej skórki liścia z kuleczkami tłuszczu. Preparat barwiony błękitem Nilu

DYSKUSJA

Badania Guilliermonda i Mangenota (1923) wykazały, że w plastydach (autorzy uważają te wczesne stadia rozwoju plastydów za chondriokonty) najpierw pojawia się tłuszcz, który znika po utworzeniu się skrobi.

Niniejsze badania nad występowaniem inkluzji tłuszczowych podczas rozwoju chloroplastów w liściach *Clivia miniata*, *Amaryllis belladonna* i *Iris germanica* dowiodły, że kuleczki tłuszczowe mogą być obecne w proplastydach obok istniejącej skrobi. Proplastydy zawierały najpierw skrobię, która zanikała po utworzeniu się tłuszczu, a więc kolejność zjawiania się skrobi i tłuszczu była inna niż to podaje Guilliermond, natomiast zgodna z obserwacjami Manuel (1936). U wspomnianych roślin krople tłuszczowe występujące w proplastydach towarzyszyły całemu normalnemu cyklowi rozwoju plastydów, ich wzrostowi, podziałom i wyróżnicowywaniu się gran.

Inkluzje tłuszczowe mogą pojawiać się w chloroplastach przejściowo. U roślin zimozielonych (*Vinca minor*, *Hedera helix*, *Buxus sempervirens*) w okresie zimy jest tłuszcz, na jego miejsce wiosną pojawia się skrobia. Zanikanie skrobi w okresie zimowym stwierdzili już dawniej: Mer (1876), Kisch i Myjake (1902).

U innych roślin (*Aloe arborescens*, *Aloe aristata*, *Dracaena fragrans*) granulacje tłuszczowe pojawiają się tylko w okresie zimy obok skrobi zachowanej w nieznacznej ilości z okresu lata. W chloroplastach mezofilu *Ophiopogon japonicus* i *Vriesea carinata* inkluzje tłuszczowe znajdują się obok skrobi w ciągu całego okresu wegetacji. W miesiącach zimowych ziarnistości te są duże i liczne, ziarna skrobi natomiast bardzo małe i nieliczne. W miesiącach letnich zaś tłuszcz występuje w postaci małych kuleczek, skrobia w formie licznych i dużych ziaren.

U *Clivia miniata* w okresie kwitnienia bardzo wyraźnie zmniejszała się ilość tłuszczu, natomiast pojawiała się skrobia, która znów znikała po przekwitnięciu i wtedy ponownie zwiększała się ilość inkluzji tłuszczowych. Wiązałoby się to z obserwacjami Hougeta (1942, 1943), który doszedł do wniosku, że cukry tworzą się w tym czasie, kiedy rezerwy tłuszczowe wyczerpują się w trakcie intensywnego rozwoju rośliny; nadmiar cukrów zostaje odłożony w postaci skrobi.

Dyskusja, którą przeprowadził Godlewski (1877) z Briosi, na temat występowania tłuszczów względnie skrobi w chloroplastach *Streptolizia*, powstała niewątpliwie stąd, że Briosi obserwując plastydy w lutym widział w nich tłuszcz, Godlewski zaś badając tę roślinę w czerwcu w czasie wysokiej temperatury, znajdował skrobię. Wiadomo,

że obniżenie temperatury powoduje przechodzenie cukrów w tłuszcze (Coster 1925 cyt. za Reilhes 1933, Reilhes 1933, 1934, 1936). Miałam okazję wielokrotnie potwierdzić te obserwacje. Jedynie w wypadku *Hedera helix*, hodowanej zimą w szklarni, obecne były tłuszcze, tak jak u *Hedera* rosnącej w ogrodzie.

Odwracalna transformacja tłuszczów w cukry znana jest w literaturze. Wereszczagin (1958) podkreśla, że tłuszcze roślinne charakteryzują się łatwością przechodzenia w węglowodany. Swiesznikowa (1954, 1955, 1956, 1958) opisała stopniowe zjawiane się tłuszczów na terenie ziarna skrobi: Proces ten zachodzi w chloroplastach i leukoplastach w pewnej fazie rozwoju owocu roślin oleistych (1956), w chloroplastach wegetatywnych części roślin po rozpoczęciu kwitnienia (1955), także w określonych etapach różnicowania się i rozwoju zarodka (1958). Autorka opisała również zjawisko przekształcania się skrobi w tłuszcze w komórkach szparkowych u roślin oleistych i w liściach kosaćca w okresie kwitnienia rośliny. Wyniki moich obserwacji są nieco inne. Pomimo dużego materiału, który przejrzałam, nie udało się jednak nigdy zaobserwować obrazów, jakie widziała Swiesznikowa, to znaczy tworzenia się tłuszczu w ziarnie skrobi, chociaż stwierdziłam niejednokrotnie, że w miejscu, gdzie poprzednio tkwiło ziarno skrobi, znajdowała się w późniejszej fazie rozwoju kula tłuszczowa. Czasami też po zastosowaniu błękitu Nilu, ziarna skrobi wykazywały w części zewnętrznej różowe zabarwienie, tak jak gdyby posiadały otoczkę tłuszczową. Również liście *Iris germanica* badane przez cały okres wegetacyjny nie zawierały nigdy w chloroplastach komórek szparkowych kropielek tłuszczu; zawsze była w nich tylko skrobia.

Dane z literatury wskazujące, że pojawianie się tłuszczów w chloroplastach może być związane ze sposobem odżywiania się rośliny, opierają się wyłącznie na wynikach badań biochemicznych; Collyer i Fogg (1955) ustalili w ten sposób, że np. brak azotu może być główną przyczyną gromadzenia się tłuszczów. Obfitość glukozy w środowisku może powodować zwiększenie ilości tłuszczów w różnych częściach komórki, jak np. w wodniczках korzenia jęczmienia (Gautheret 1934) oraz w chloroplastach *Selaginella* (Bose 1943).

Obecność inkluzji tłuszczowych w chloroplastach od najwcześniejszych stadiów rozwojowych komórki, zmienna ilość tłuszczu zależna od wieku rośliny i pory roku, zanikanie tłuszczów, a pojawianie się skrobi oraz zanikanie skrobi i pojawianie się tłuszczów — dowodzi, że substancje tłuszczowe występujące w formie ziarnistości, w plastydach powinny być traktowane jako substancje zapasowe, a nie jako wyraz degeneracji plastydów, jak to uważali Schimper (1885), Mayer (1920) i Guillier-

mond (1923). Zdaniem wymienionych autorów dowodu dostarczyć miał fakt, że próby zaciemniania roślin nie prowadziły do zmniejszania się ilości inkluzji tłuszczowych, co miało świadczyć, że tłuszcz ten nie jest wykorzystywany przez rośliny. Jednak, jak wiemy z własnych doświadczeń (Mikulska 1959), po dłuższych (1—2-tygodniowych) próbach zaciemniania roślin zimozielonych, chloroplasty mezofilu niejednokrotnie nie wykazywały również zmniejszonej ilości skrobi, a trudno przecież twierdzić na tej podstawie, że skrobia nie jest zużywana w procesach metabolicznych. Za najbardziej przekonujący dowód, przemawiający przeciwko traktowaniu tych tłuszczów jako produktu degeneracji plastydów, uważam stwierdzony przeze mnie fakt, że chloroplasty zawierające tłuszcze są w pełni zdolne do tworzenia skrobi w warunkach eksperymentalnych. Wydaje się przeto, że tłuszcze występujące w chloroplastach liści roślin w warunkach normalnych powinny być traktowane jako substancja zapasowa, zjawiająca się najprawdopodobniej na drodze fotosyntezy, jak to postulowali Borodin (1878), Mangenot (1922) i Buscaloni (1912).

W czasie zaciemniania roślin spotykałam bardzo często obrazy nie-normalne, powstałe w wyniku uszkodzenia chloroplastów, a polegające na odmieszaniu się tłuszczów konstytucyjnych (lipofaneroza). W plastydach zwiększała się wówczas wyraźnie ilość tłuszczu. Ukazywało się mnóstwo kuleczek tłuszczowych. Odróżnienie tłuszczów pochodzących z lipofanerozy od tłuszczów, które normalnie występują w zdrowych chloroplastach, było trudne. Badania cytochemiczne takich chloroplastów wykazały, że nastąpiło znaczne zwiększenie ilości tłuszczów obojętnych, których pojawienie się przypisuję procesowi lipofanerozy. Identyczne zjawisko stwierdziła u *Spirogyra* Olszewska (nie publ.). Nie zauważyłam natomiast zwiększania się zawartości kwasów tłuszczowych, chociaż z badań biochemicznych wiadomo (Crombie 1958), że występują one w chloroplastach.

Obserwacje cytochemiczne przedstawione w niniejszej pracy dowiodły, że inkluzje tłuszczowe w chloroplastach mezofilu badanych roślin są mieszaninami, których skład zależy od wieku rośliny lub od warunków, w jakich roślina przebywa. W najmłodszych stadiach rozwojowych plastydów pojawiają się tłuszcze obojętne. W plastydach starszych, obok istniejących tłuszczów obojętnych, występują kwasy tłuszczowe i fosfolipidy. W roślinach etiolowanych inkluzje tłuszczowe wykazują prawie wyłącznie tłuszcze obojętne i znikome ilości fosfolipidów. W okresie letnim zmniejsza się też wyraźnie ilość kwasów tłuszczowych.

Kule tłuszczowe obecne w chloroplastach liści *Iris germanica* nie zawierały fosfolipidów, a tylko tłuszcze obojętne lub kwasy tłuszczowe.

W późniejszych stadiach rozwojowych dookoła substancji tłuszczowych pojawiała się otoczka białkowa utrudniająca reakcję z błękitem Nilu; można by więc uważać te substancje za tłuszcze maskowane (Buvat 1936). Podobne otoczki białkowe widział w „sterynoplastach“ Mirande (1923), Reilhes (1933, 1934, 1936) dookoła kul tłuszczowych występujących w wodniczkach oraz Manuel (1936) w inkluzjach tłuszczowych w chloroplastach niektórych przedstawicieli z rodziny *Cactaceae*.

STRESZCZENIE

Badania przeprowadzone nad chloroplastami mezofilu szeregu roślin jedno- i dwuliściennych wykazały w nich obecność inkluzji tłuszczowych.

Krople tłuszczu znajdujące się w chloroplastach liści *Iris germanica*, *Clivia miniata* i *Amaryllis belladonna*, występują w ciągu całego rozwoju plastydów. W proplastydach towarzyszą one ziarnom skrobi, w późniejszych stadiach rozwoju plastydów występują same.

W okresie kwitnienia *Clivia miniata* stwierdzono zmniejszanie się kul tłuszczowych lub nawet całkowite ich zanikanie, a pojawianie się skrobi w chloroplastach wszystkich stref liścia. Po przekwitnięciu skrobia zanikała, pojawiał się natomiast tłuszcz lub zwiększała się jego ilość. W innych okresach wegetacji rośliny skrobia jest obecna w proplastydach występujących wyłącznie w niezazielenionej strefie liścia.

W chloroplastach liści *Aloe arborescens*, *Aloe aristata*, *Dracaena fragrans* granulacje tłuszczowe pojawiają się w okresie zimy obok nieznacznej ilości skrobi i zanikają całkowicie w okresie lata ustępując miejsca zwiększonej ilości skrobi.

W chloroplastach mezofilu *Ophiopogon japonicus* i *Vriesea carinata* inkluzje tłuszczowe znajdują się obok skrobi w ciągu całego okresu wegetacji. W miesiącach zimowych ziarnistości te są duże i liczne, ziarna skrobi natomiast bardzo małe i nieliczne. W miesiącach letnich stosunek ten ulega zmianie: tłuszcz występuje w postaci małych i nielicznych kuleczek, skrobia w formie dużych i licznych ziaren.

Chloroplasty liści *Haemanthus* i *Sansevieria* zawierają krople tłuszczu tylko w miesiącach zimowych, nie wykazują zaś obecności skrobi ani latem, ani zimą.

W chloroplastach roślin zimozielonych (*Hedera helix*, *Vinca minor*, *Buxus sempervirens*) w okresie zimy występują tylko kule tłuszczu, wiosną, latem i wczesną jesienią — wyłącznie ziarna skrobi.

Udowodniono na podstawie badań cytochemicznych, że inkluzje tłuszczowe, znajdujące się w bardzo młodych chloroplastach, składają się

z tłuszczów obojętnych. W starszych chloroplastach ciała te stanowią mieszaninę złożoną z tłuszczów obojętnych, kwasów tłuszczowych i fosfolipidów.

W starszych chloroplastach liści *Iris germanica* granulacje tłuszczowe utworzone są bądź z tłuszczów obojętnych, bądź z kwasów tłuszczowych i posiadają dodatkowo otoczkę białkową.

Na podstawie uzyskanych wyników uważa się, że inkluzje tłuszczowe występujące w plastydach nie są produktem ich degeneracji. Za najważniejsze dowody uznano fakty, iż: 1. krople tłuszczowe pojawiają się już w proplastydach i towarzyszą całemu cyklowi rozwojowemu plastydów; 2. chloroplasty roślin zimozielonych zawierające krople tłuszczu nie tracą zdolności do tworzenia skrobi w warunkach eksperymentalnych; 3. w chloroplastach w trakcie rozwoju rośliny zachodzi zjawisko odwracalnej transformacji tłuszczów i węglowodanów. Zjawisko to polega na kolejnym występowaniu skrobi lub tłuszczów w chloroplastach, zależnie od wieku rośliny lub pory roku.

Wobec powyższego wyraża się pogląd, że opisane tłuszcze są substancją zapasową.

Pani prof. dr A. Wałek-Czerneckiej pragnę wyrazić głęboką wdzięczność za cenne wskazówki, krytyczne uwagi oraz za życzliwość okazywaną mi w trakcie wykonywania pracy.

Katedra Anatomii i Cytologii
Roślin Uniwersytetu Łódzkiego

(Wpłynęło dn. 30.3.1960 r.)

RÉSUMÉ

Les recherches présentes ont mis en évidence la présence d'inclusions lipidiques dans les chloroplastes du mésophylle de plusieurs Mono- et Dicotylédones.

Les gouttelettes de lipides dans les chloroplastes des feuilles d'*Iris germanica*, *Clivia miniata* et *Amaryllis belladonna* apparaissent pendant toute la période de développement des plastes. Dans les proplastides, au stade d'amyloplast, les lipides accompagnent les grains d'amidon, mais aux étapes postérieures de développement des plastes, il apparaissent seuls.

Chez *Clivia miniata*, les grains lipidiques diminuent de taille pendant la période de floraison, parfois disparaissent complètement, et il se forme de l'amidon dans les chloroplastes de toutes les zones de la feuille. La floraison terminée, l'amidon disparaît. Par contre les lipides se forment ou leur quantité augmente. Au cours des autres phases de végétation de la plante, l'amidon n'est présent que dans les proplastides de la zone non verte de la feuille.

Dans les chloroplastes des feuilles d'*Aloe arborescens*, *Aloe cristata*, *Dracena fragrans*, les granulations lipidiques apparaissent en hiver et

sont accompagnées d'une quantité très faible d'amidon; en été les lipides disparaissent complètement tandis que la quantité d'amidon est augmentée considérablement.

Dans les chloroplastes du mésophylle d'*Ophiopogon japonicus* et *Vriesea carinata*, les inclusions lipidiques se trouvent à côté de l'amidon pendant toute la période de végétation. En hiver ces granulations sont nombreuses et grosses, par contre les grains d'amidon sont fort petits et peu nombreux. En été ce rapport est modifié: les lipides sont présents sous la forme de petites gouttelettes peu nombreuses, tandis que les grains d'amidon deviennent nombreux et volumineux.

Les chloroplastes des feuilles de *Haemanthus* et *Sansevieria* ne contiennent des gouttelettes de lipides que pendant les mois d'hiver; l'amidon est absent aussi bien en hiver qu'en été.

Les chloroplastes des plantes hivernales (*Hedera helix*, *Vinca minor*, *Buxus sempervirens*) ne renferment en hiver que les gouttelettes de lipides, tandis qu'au printemps, en été et en automne précoce — des grains d'amidon seulement.

Nous avons démontré, par des méthodes cytochimiques, que les inclusions lipidiques contenues dans les chloroplastes très jeunes se composent de lipides neutres. Dans les chloroplastes plus âgés, ces corps gras constituent un mélange de lipides neutres, d'acides gras et phospholipides.

Dans les chloroplastes plus âgés des feuilles d'*Iris germanica* les granulations lipidiques contiennent soit des lipides neutres, soit des acides gras et sont entourées d'une pellicule protéique.

Nos recherches donnent à penser que les inclusions lipidiques ne peuvent pas être considérées comme étant résultat de la dégénérescence des plastes. Cette conclusion est basée sur les arguments suivants: 1. Les grains lipidiques apparaissent déjà dans les proplastides et subsistent pendant tout le cycle de développement des plastes.

2. Les chloroplastes des plantes hivernales, comprenant des grains lipidiques, gardent la capacité à former de l'amidon dans les conditions expérimentales.

3. Au cours du développement de la plante il se produit dans les chloroplastes un phénomène de transformation réversible des lipides et des glucides; ce phénomène consiste en la présence alternée dans les chloroplastes d'amidon et de lipides suivant l'âge de la plante ainsi que la saison.

Nos résultats indiquent que les substances lipidiques en question constituent une substance de réserve.

LITERATURA

- Barolier J., Suchowsky G., 1958, Eine neue Methode zur Darstellung von Doppelbindungen in den Fettsäurebausteinen von Lipoiden, *Acta Histochem.*, 5: 297—299.
- Beauverie, J., 1928, Sur la valeur des inclusions huileuses ou lipidiques des plastes (leuco- ou chloroplastes) et des mitochondries, *C. R. Soc. Biol.* 58: 311—312.

- Bose S. R., 1943, Role of Pyrenoids in *Algae* and of vacuoles in plastids of Higher plants and in *Fungi*, Bot. Gaz., 104: 633—638.
- Buvat M. R., 1936, Lipides intravacuolaires dans les méristèmes des certaines racines, Rev. Cyt. Cytophys. 2: 299—336.
- Caruso C., 1938, Quelques remarques sur les chlorochromoplastes, Protoplasma, 30: 341—391.
- Caruso C., 1939, Leucolipidiplasti a cellula sebose in *Cephalocereus euphorbioides*, Protoplasma 32: 169—183.
- Collyer D., Fogg G. E., 1955, Studies on Fat Accumulation by *Algae*, J. Exp. Bot. 6: 256—275.
- Crombie W. M., 1958, Fatty acids in Chloroplasts and Leaves, J. Exp. Bot., 9: 254—261.
- Faull A. F., 1935, Elaioplasts in Iris: A morphological study. Journ. Arn. Arb., 222—267.
- Gautheret R., 1934, Sur la présence de lipides dans les vacuoles des plantules d'orge, C. R. Soc. Biol. 116: 809—810.
- Godlewski E., 1877, Ist das Assimilationsprodukt der Musaceen Oel oder Stärke, Flora 14: 215—220.
- Guilliermond A., 1921, Sur les microsomes et les formations lipoides de la cellule végétale C. R. Ac. 172: 1676—1678.
- Guilliermond A., Mangenot G., 1923, Sur „Autoplastensekret“ et le „Mese-kret“ d'Arthur Meyer, C. R. Soc. Biol. II, 89: 240—242.
- Guilliermond A., Mangenot G., Plantefol L., 1933, Traité de cytologie végétale, Paris.
- Holle H. G., 1877, Über die Assimilationsthätigkeit von *Strelitzia Reginae*, Flora, 8: 113—120.
- Houget M. J., 1943, Sur le mécanisme de la transformation des lipides en glucides au cours de la germination du Ricin, C. R. Ac. Sc. 216: 321—322.
- Houget M. J., 1924, Sur la formation des glucides au cours de la germination du Ricin, C. R. Ac. Sc. 215: 387—388.
- Kischi Miyaké, 1902, On the starch of evergreen leaves and its relation to photosynthesis during the winter, Bot. Gaz. 5: 321—340.
- Li Koué Tchong, 1924, L'origine des inclusions graisseuses chez quelques Algues, C. R. Soc. Biol., II: 263—265.
- Luksenburgowa A., 1928, Badania cytologiczne nad pyłkiem u malwowatych, Rozpr. Wydz. Mat. Przyr. Polsk. Akad. U.; 84—151.
- Lilie R. D. 1954, Histopathologic Technic and Practical Histochemistry, New York.
- Lison L., 1934, Sur le nouveaux colorants histologiques specifiques des lipides, C. R. Soc. Biol., 115: 202—205.
- Mangenot G., 1922, Recherches sur les constituants morphologiques du cytoplasme des Algues, Arch. Morph. gén. et exp., 9: 325.
- Manuel J., 1936, Recherches sur la formation de stérides dans les chloroplastes de certaines Cactées, Rev. Gen. Bot., 45: 49—79.
- Mazia B., Brewer P. A., Alfert M., 1953, The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue, Biol. Bull., 104: 57—67.
- Mer M. E., 1876, De la constitution et de fonction des feuilles hivernales, Bull. Soc. Bot. de France, 23: 231—238.
- Mikulska E., 1957, Chloroplasty w liściach roślin zimozielonych, Acta Soc. Bot. Pol., 26: 551—564.

- Mikulska E., 1959, Chloroplasty w skórcie liści roślin dwuliściennych, *Acta Soc. Bot. Pol.*, 28: 143—173.
- Mirande M., 1923, Sur la nature protéolitique des stérinoplastes de *Lis blanc*, *C. R. Ac. Sc.*, 176: 596—598.
- Molisch H., 1921, *Mikrochemie der Pflanze*, Jena.
- Olszewska M. J., 1959, Badania cytologiczne nad *Spirogyra*, (nie opubl.).
- Pearse A. G. E., 1957, *Histochemia teoretyczna i stosowana*, Warszawa.
- Reilhaes R., 1933, Sur la présence dans les fleurs de *Lilium candidum* et de *Lilium longiflorum* *Harrissi* de concrétions vacuolaires lipoprotéiques semblables aux „sterinoplastes”, *C. R. Soc. Biol.*, 113: 993—996.
- Reilhaes R., 1933, Sur la nature chimique et signification des sterinoplastes, *C. R. Soc. Biol.*, 113: 267—270.
- Reilhaes R., 1934, Modifications des concrétions lipidiques (sterinoplastes) de Mirande dans le bulbe de *Lilium candidum*, suivant la température, *C. R. Ac. Sc.*, 198: 1629—1631.
- Reilhaes R., 1934, Sur la constitution chimique des concrections lipidiques (sterinoplastes de Mirande) des cellules épidermiques des écailles du bulbe de *Lilium candidum*, *R. R. Soc. Biol.* (1), 115: 622—625.
- Reilhaes R., 1936, Stérides et phospholipides dans le système vacuolaire de la cellule végétale, *Rev. Cyt.* II, 98—210.
- Schimper A. F. W., 1885, Untersuchungen über die Chlorophyllkörner und die ihnen homologen Gebilde, *Jb. wiss. Bot.*, 16: 1—247.
- Swieszniakowa I. H., 1954, O wozniknowienii żira w krochmalnych zernach, *Dokł. Akad. Nauk SSSR*, 95: 889—892.
- Swieszniakowa I. H., 1955 O wozniknowienii żira w plastidach, *Dokł. Akad. Nauk SSSR*, 102.
- Swieszniakowa I. H., 1956, Rol rozlicznych organoidów komórki w obrazowaniu i nakopieniu żira, *Fizjol. Rasten.*, 3: 3—9.
- Swieszniakowa I. H., 1958, O powiedienii krochmala w płodach maslicznych rastenij, *Dokł. Akad. Nauk SSSR*, 118: 604—606.
- Wereszczagin A. G., 1958, Obmen zapasnych żirow w rastenijach, *Usp. Sowr. Biol.*, 45: 114—128.
- Zweibaum J., Mangenot G., 1923, Application à l'étude histochemique des végétaux d'une méthode permettant la coloration vitale et postvitale des graisses de la cellule animale, *C. R. Soc. Biol.*, 89: 540—542.