

M. Spurný a Z. Sladký:

Užití floroglucinové reakce při studiu lignifikace blan buněčných

Práce z ústavu pro fyziologii rostlin na přírodovědecké fakultě MU v Brně

I. Úvod

Floroglucin s kyselinou solnou (F reakce) patří k nejužívanějším reakcím k důkazu ligninu v blanách buněčných (Philips 1946, Bardinskaja 1950). Práce, které sledovaly změny v lignifikaci podle stupně zabarvení blány po F reakci (Schilling 1923, Jaeger 1928, Bardinskaja 1950) nutno přijímat velmi kriticky, poněvadž novější názory shodně ukazují, že nositelem barevných reakcí fenolů a aminů se zdřevnatělými blanami buněčnými jsou průvodní látky ligninu a ne lignin jako celek (Kürschner 1952, tam také souborná literatura o jednoznačnosti F reakce).

K stanovení meze použitelnosti této reakce a současně k ověření výše uvedeného názoru bylo užito F reakce při sledování postupné lignifikace blan buněčných tvrdého lýka rostliny *Abutilon avicennae* během vegetační periody. Předpoklad úměrnosti intensity zabarvení F reakce a obsahu ligninu v blanách buněčných byl zhodnocen srovnáním získaných výsledků s výsledky hydrolysy vláken s 72% kyselinou sírovou.

II. Materiál a metoda

Semena rostliny *Abutilon avicennae*, dodaná výzkumným ústavem předních rostlin v Šumperku-Temenici ze sklizně roku 1951, byla vyseta 16. dubna 1952 do záhonů ve sponu 20×20 cm. Během vegetační periody byly odebrány vzorky rostlin ke zhotovování příčných řezů osami na basi (1 cm nad děložními listy) a středem; současně bylo bráno vždy 8 rostlin k chemickým analysám na lignin.

Na příčném řezu osou rostliny *Abutilon avicennae* je patrné celkové uspořádání svazků tvrdého lýka (obr. 1). Příčné řezy byly zhotovovány zmrazovacím mikrotomem z čerstvého materiálu; průměrná tloušťka řezů byla 30μ (při zhotovování tenčích řezů vzniká nebezpečí vypadávání svazků tvrdého lýka z okolního pletiva). Pro hodnocení zdřevnatění bylo užito F reakce v ředění podle Clarkea (1935), a to:

1 g krystalového floroglucinu v 800 ml 37% HCl rozpustit a zředit destilovanou vodou na 1500 ml. Doba barvení 5 min. Hodnocení výsledků barevné reakce bylo nutno provést ihned po uplynutí doby barvení, neboť zabarvení blan buněčných se rychle mění; v literatuře uváděná metoda k zachování odstínů montováním řezů do směsi glycerin-kyselina sírová v poměru 5:1 (Kisser a Steininger 1950) se neosvědčila.

Aby bylo možno nalezené odstíny zabarvení vzájemně srovnávat, byla zhotovena barevná škála na neosvětlené, ustálené fotografické desce, kde jednotlivé odstíny F reakce byly pokud možno věrně reprodukovány všaknu-

tím anilových barev do želatinové vrstvy. Srovnávací škála má tyto stupně zabarvení:

stupeň	zabarvení
0	jasně žluté
1	žlutohnědé (okr světlý)
2	červenohnědé (okr s fialovou)
3	jasně fialové
4	intenzivně červenofialové (třešňově červené)

V této škále jsou zahrnuty všechny odstíny, nalezené po obarvení floroglucinem v blanách buněčných tvrdého lýka zralých rostlin *Abutilon avicennae*.

stupeň	Lokace zabarvení na příčných řezech osami rostlin získaných z výše uvedeného ústavu (viz obr. 1):
0	blány buněčné v primárních svazcích vláken v apikální části osy,
1	blány buněčné v primárním svazku vláken ze střední části os, blány buněčné v nejmladší řadě vláken sekundárního svazku v celé ose (řada 7),
2	blány buněčné vnitřní poloviny primárního svazku v celé ose,
3	blány buněčné sekundárního vlákna řad 1—6,
4	střední lamely buněk v primárním vláknu (pro srovnání: též zabarvení blan buněčných v dřevní části svazku cévního).

Byl učiněn předpoklad, že se zvyšujícím se stupněm zabarvení poroste procentuální obsah ligninu v blanách buněčných, takže stupni 0 bude odpovídat nejnižší % obsahu ligninu a stupni 4 nejvyšší.

Hodnocení zabarvení v preparátech bylo prováděno za konstantního osvětlení mikroskopickou lampou v temné komoře. Kvantitativní analýsy ligninu byly prováděny z vláken, získaných biologickou cestou (máčením) ve Výzkumném ústavu prádlných rostlin v Šumperku-Temenici. Bylo užito metody podle Ritter, Seborg a Mitchella (citováno podle Wise 1946) s 72% kyselinou sírovou.

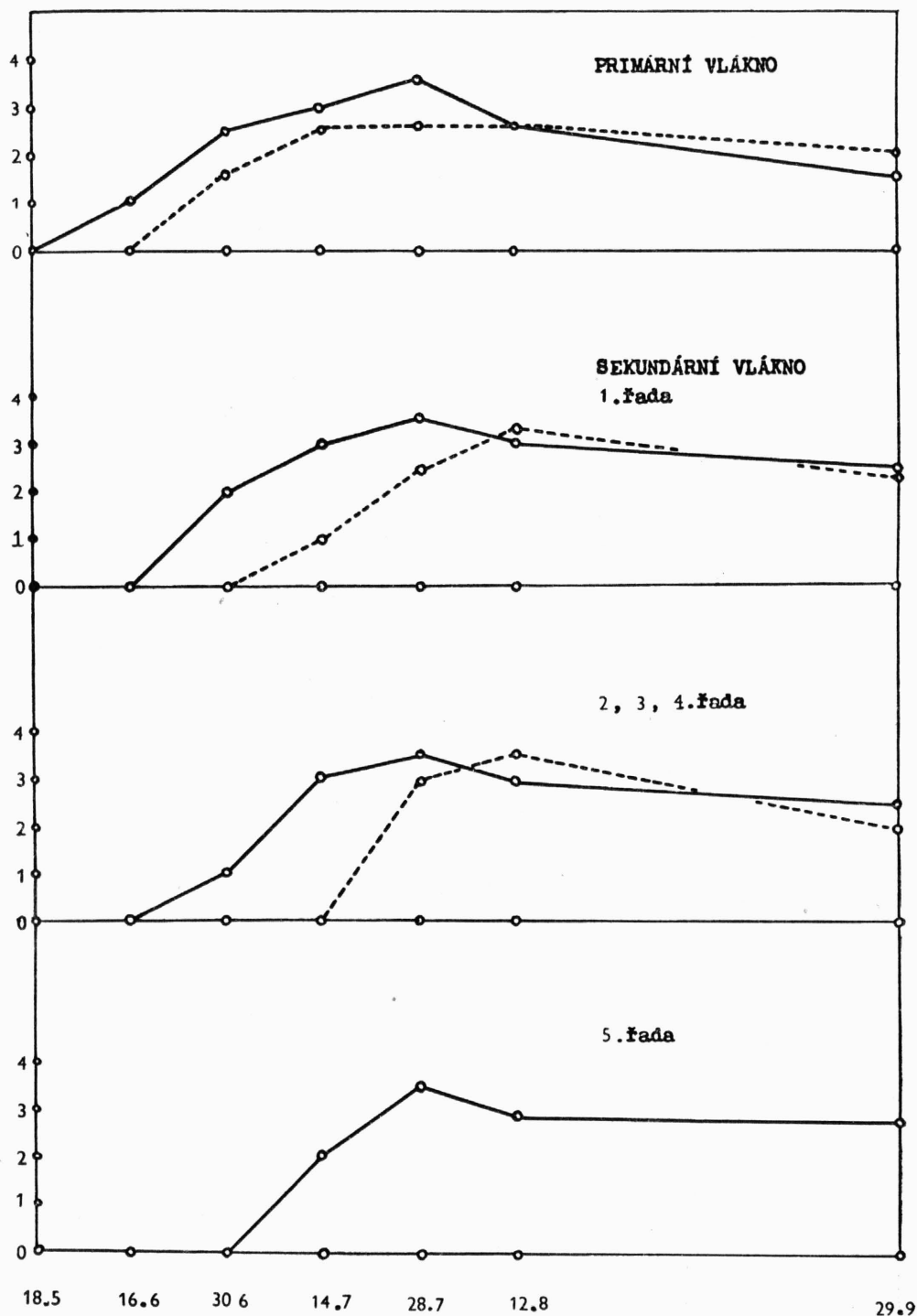
III. Výsledky pokusů

Výsledky F reakce (zabarvení hodnoceno podle stupňů srovnávací škály — viz část II této práce) blan buněčných tvrdého lýka primárního a víceřadého sekundárního svazku na příčných řezech osou rostlin *Abutilon avicennae* z jednotlivých dob sběru jsou sestaveny v tabulce č. 1 s připojenou charakteristikou rostlin. Pro přehlednost jsou získaná data barevných hodnot sestavena v grafu č. 1.

Graf. 1. Změny v zabarvení blan buněčných primárního a víceřadého sekundárního svazku tvrdého lýka rostlin *Abutilon avicennae* po F reakci během vegetační periody. Abscissa: doba sběru rostlin, ordináta: stupně zabarvení blan buněčných podle srovnávací škály. Plně vytažené křivky přísluší zabarvením, zjištěným v příčných řezech na basi osy, čárkované z její střední části.

Graf 1. The changes in the colour-intensity of the cell walls of the primary and secondary bast fibers-bundle after the F reaction during the development of the plant *Abutilon avicennae*.

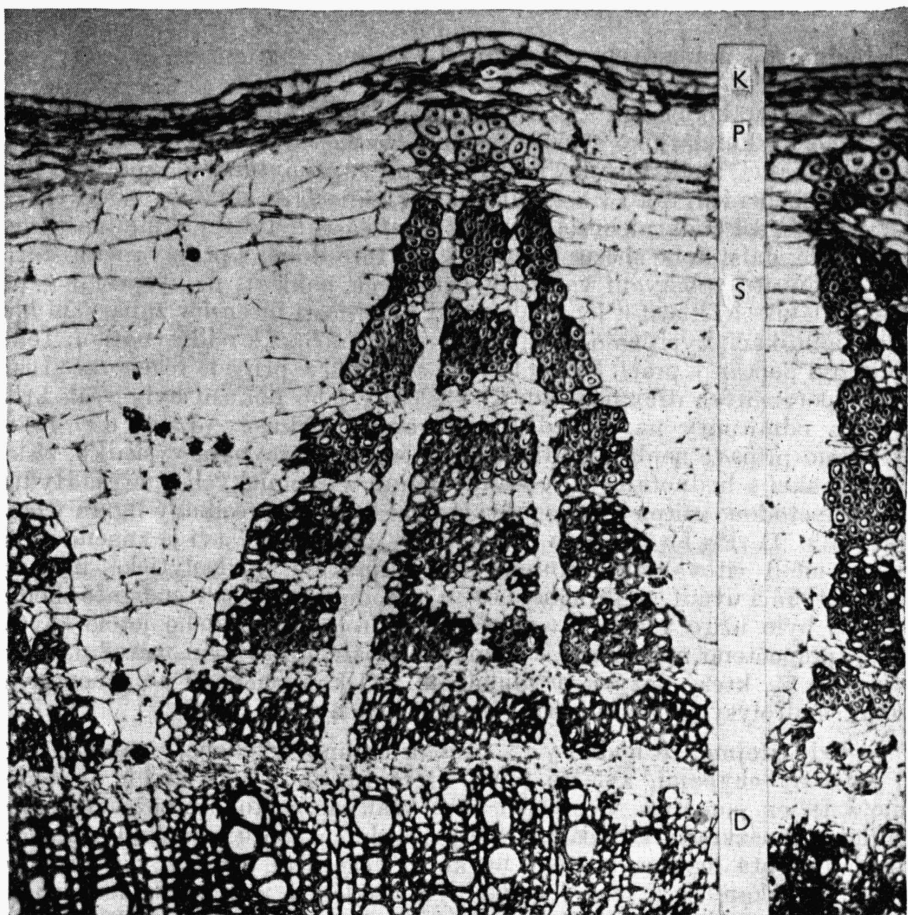
Abscisse: dates of cultivation, ordinate: the gradation of colour of the cell walls after the F reaction. Curves indicating the colour-changes observed in the cross section taken from the basal part of the stem are drawn with the full line; those belonging to the colour-changes obtained from the middle part of the stem, with a dotted one. The values are taken from the table 1.



Tab. 1.

Doba kultivace (1952)	Popis rostlin	Stupeň zabarvení blan buněčných tvrdého lýka v příčném řezu osou rostlin <i>Abutilon avic.</i>			
		na basi 1		středem 2	
		primární vlákno	víceřadé sekundární vlákno	primární vlákno	víceřadé sekundární vlákno
16. V. 18. V.	Výsev semen První asimilační list. Základ primárního svazku vláken	0	—	—	—
16. VI.	Délka os 45 cm, průměr os na basi 7,5 mm. Založeny květní pupeny.	1	0	0	—
30. VI.	Délka os 62 cm, průměr os na basi 8,5 mm. Počátek květní fáze.	2—3	1. řada: 2 2. řada: 1	1—2	0
14. VII.	Délka os 130 cm, průměr os na basi 13 mm. Maximum květní fáze, tvorba tobolek.	3	1., 2., 3., 4. řada: 3 5. řada: 2	2—3	1
28. VII.	Délka os 140 cm, průměr os na basi 14 mm. Zrání plodů.	3—4	1.-6. řada: 3—4	2—3	1. řada: 2-3 2. řada: 3
12. VIII.	Délka os 140 cm, průměr os na basi 14 mm. Většina jedinec má zralé tobolky. Listy opadají.	2—3	1.-7. řada: 3	2—3	1. řada: 3 2. řada: 3-4
29. IX.	Délka os 155 cm, průměr os nezměněn. Vyzrálá semena. Osy bez listů.	1—2	1.-3. řada: 2—3 4.-6. řada: 3 7. řada: 2 8. řada: 0-1	2	1. řada: 2-3 2. řada: 2

Výsledky kvantitativních analys ligninu, získané metodou jak uvedeno v odd. II, jsou sestaveny v tab. č. 2. Vzhledem k omezenému množství pokusného materiálu, byly prováděny vždy jen dvě paralelní analysy. Výsledky



Obr. 1. Příčný řez osou dospělé rostliny *Abutilon avicennae* na basi. Primární vlákno (P), šest řad svazků sekundárního vlákna (S_{1-6}), pokožka (K), dřevní část svazku cévního (D).

Fig. 1. A cross section from the basal part of the stem of a fully matured plant *Abutilon avicennae*. The primary bast fibers (P), the secondary bast fibers (six ranges S_{1-6}), cuticle (K), a part of the xylem (D).

Tab. 1. Změny v zabarvení blan buněčných tvrdého lýka rostlin *Abutilon avicennae* po F reakci během vegetační periody.

Table 1. The changes in the colour-intensity of the cell walls of the primary and secondary bast fibers-bundle after F reaction during the development of the plant *Abutilon avicennae*. Gradations of colour in the cross sections taken from the basal part of stem are summarised in the column 1; those, obtained from the middle part are carried out in the column 2.

ukazují, že přísným dodržením konstantních podmínek, za nichž hydrolysa vláken probíhá, lze získat hodnoty v paralelních analysách, lišící se v desetinách %.

IV. Zhodnocení pokusných výsledků

Z výsledků hodnocení změn lignifikace blan buněčných tvrdého lýka primárního i sekundárního svazku rostlin *Abutilon avic.* podle stupně zabarvení po F reakci, sestavených v grafu 1, vyplývá, že intensita zabarvení stoupá jak v primárních, tak i v sekundárních vláknech až do doby sběru 28. 7. Jen v případě sekundárních vláken ze střední části lodyhy je kulminační bod dosažen až v další době sběru, t. j. 12. 8. Po této době, s přibývajícím stářím rostlin, intensita zabarvení ve všech případech poklesá, nejvýrazněji v primárních vláknech. Platil-li by předpoklad úměrnosti intenzity zabarvení blan s jejich lignifikací, vyplývalo by z výsledků, že dochází k oddřevnatění. Tento jev sice byl popsán v práci Schillinga (1923) v případě regenerace růstu a dělení poraněných dřevních buněk; výsledky jeho pokusů byly však kritizovány a odmítnuty na základě opakovaných pokusů (Jaeger 1928). Ze v našem případě nejde o oddřevnatění, ukazuje srovnání výsledků, získaných F reakcí s hodnotami % obsahu ligninu z chemických analys. Hydrolytickou metodou, užitou v této práci, byl získán t. zv. celkový lignin (total-lignin podle L. Palohaimo 1925, 1929), jehož množství je značně vyšší, než užíjeme-li citovaným autorem užitě upravené hydrolytické metody; v citované práci uvádí, že Pringheimovou metodou (metoda v podstatě shodná s tou, již bylo užito v této práci) získal hydrolysou mladého jetele zbytek 20,5 % (přepočteno na sušinu). Z téhož materiálu upravenou metodou získal zbytek 9,6 %, který nazývá ortoligninem. (O konvenčnosti obměňovaných metodik hydrolysy jiných autorů viz Kürschner (1952).

Je tedy zřejmé, že hodnoty % obsahu ligninu, uvedené v tabulce č. 2, jsou zatíženy chybami, zvláště těmi, které uvádí Palohaimo; jejich hodnota je jen poměrná. Vyplývá z nich však, že celkové množství ligninu (total-ligninu) nezvratně stoupá se zvyšující se dobou sběru; poněkud neúměrné zvýšení procenta ligninu, zjištěné na konci vegetační periody, odráží se ve výsledcích, získaných F reakcí, nápadným poklesem v intenzitě nalezených zabarvení. Lze tedy z výsledků této práce znovu potvrditi nespécifičnost F reakce na lignin; z intenzity zabarvení možno usuzovat jen na změny v obsahu průvodních látek, které se spoluúčastní tvorby ligninu. Jak uvádí Kürschner (1952), jest nositelem F reakce ve zdřevnatělých blanách buněčných koniferylalkohol. Klason (1929) udává, že filtrační papír, napojený roztokem koniferylalkoholu, dává pozitivní test s floroglucinem + HCl v přítomnosti vhodného přenašeče kyslíku. Manskaja a Bardinskaja (1952), které sledovaly otázku tvorby a hromadění aromatických látek (labilně vázaná část ligninu — lignin F) v tvořícím se dřevu během vegetační periody, uvádějí, že bylo zjištěno hromadění ligninu F reakcí až do poloviny června; pak obsah těchto látek poklesal. Paralelně s ním se však zvyšovalo množství ligninu M (ligninový zbytek po hydrolyse — ortolignin ve smyslu L. Palohaimo). Pokles obsahu koniferylalkoholu (jako hlavní podíl v ligninu F) ke konci vegetačního období je tedy spjat se zvýšením obsahu celkového ligninu.

Z celkového zhodnocení použitelnosti F' reakce při studiu lignifikace lýkových vláken rostlin *Abutilon avicennae* tedy vyplývá, že předpoklad úměrnosti zabarvení blan buněčných po F' reakci s obsahem ligninu, stanoveným hydrolyticky, neplatí. Nejzřetelněji se tento fakt projevuje v případě primárních vláken, kde zabarvení blan buněčných ke konci vegetační periody se blíží zabarvení, nalezenému v raných fázích vývoje vláken; výsledky chemických analys, které se shodují s výsledky jiných autorů (B o r š č e v o v á 1951), odhalují však kvalitativní rozdíl mezi těmito buněčnými blannami shodně se barvicími, co se obsahu ligninu týče. Také v případě porovnání lignifikace primárních se sekundárními vlákny se projevil rozpor: méně intenzivně se barví primární vlákna by ukazovala na menší lignifikaci. A přesto sekundární vlákna jsou méně lignifikována, což ukazují hodnoty příslušných chemických analys, potvrzené údaji z literatury (B o r š č e v o v á 1951).

Lze tedy F' reakci přiřknouti hodnotu jen jako reakci pouze orientační k rozlišení zdřevnatělých a nezdřevnatělých membrán; tím, že jejím nositelem je koniferylalkohol, a ne molekula ligninu jako celek, nelze ji užítí při studiu lignifikace blan buněčných za předpokladu úměrnosti zabarvení s obsahem ligninu.

Tab. 2.

Doba sběru rostlin (1952)	% ligninu, vztaženo na sušinu hmoty vláken, svazku	
	primárního	sekundárního
14. VII.	14,65	14,61
	14,57	14,50
	14,61 průměr	14,55 průměr
28. VII.	15,99	15,18
	15,85	14,81
	15,92 průměr	14,99 průměr
29. IX.	18,84	17,96
	19,08	17,78
	18,96 průměr	17,87 průměr

Tab. č. 2. Změny v obsahu ligninu v blanách buněčných primárních a sekundárních vláken tvrdého lýka rostlin *Abutilon avicennae* během vegetační periody.

Table 2. The changes of the lignin content in the cell walls of the primary and secondary bast fibers—bundle of *Abutilon avicennae* in relation to the plants maturity.

V. Souhrn

1. Předpoklad úměrnosti intenzity zabarvení po F reakci s obsahem ligninu, stanoveným hydrolyticky 72% kyselinou sírovou, byl ověřován při studiu postupného dřevnatění blan buněčných tvrdého lýka rostlin *Abutilon avicennae*.

2. Výsledky ukázaly, že výše uvedený předpoklad neplatí; jelikož nositelem F reakce v blanách buněčných je pravděpodobně koniferylalkohol, zvyšuje se intenzita zabarvení blan po F reakci jen do určité fáze vývoje rostlin, kdy tato látka se v blanách buněčných hromadí. V lýkových vláknech rostlin, které dokončily svůj vegetační cyklus, intenzita zabarvení poklesá, avšak obsah ligninu v blanách buněčných, stanovený hydrolyticky, nezvratně stoupá.

3. Lze tedy F reakci přiřknout hodnotu jen jako orientačnímu testu k rozlišení zdřevnatělých a nezdřevnatělých membrán; při studiu lignifikace blan buněčných za předpokladu úměrnosti zabarvení s obsahem ligninu ji nelze užít.

Literatura

- Bardinskaja, M. S. (1950): O cvetnych reakciach na lignin. Doklady akad. nauk SSSR 73 : 345.
- Bardinskaja, M. S. (1950): K voprosu obrazovania lignina v rastěniach. Doklady akad. nauk SSSR 73 : 133.
- Borščevova, E. P. (1951): Vlákno Abutilonu (v rukopise).
- Clarke, S. H. (1935): The structure of the wood of ash. Princes Risborough Dep. Sci. Ind. Res. for Prod. Res. Labor. Proj. 9 Progr. Rep. : VI.
- Jaeger M. (1928): Untersuchungen über die Frage des Wachstums und der Entholzung verholzter Zellen. Jahrb. f. wiss. Bot. 68 : 345.
- Kisser, J. a Steininger, A. (1950): Versuche zur Haltbarmachung der Phloroglucin-Salzsäure-Reaktion. Mikroskopie 5 : 39.
- Klason, P. (1929): Cit. podle Kürschner K. (1952): Chemie dřeva. II. svazek technologie dřeva. Bratislava, p. 1—509.
- Kürschner, K. (1952): Chemie dřeva. II. svazek technologie dřeva. Bratislava, p. 1—509.
- Manskaja, S. M. a Bardinskaja, M. S.: Lignin formirujuščesja drevesiny. Biochimija 17 (6) : 711—718.
- Paloheimo, L. (1925): Die Verwendung der Säurehydrolyse zur Ligninbestimmung. Biochem. Ztschr. 165 : 463.
- Paloheimo, L. (1929): Beiträge zur Ligninbestimmung mit Säurehydrolyse. Biochem. Ztschr. 214 : 161.
- Phillips, M. v knize: Wise L. E. (1946): Wood Chemistry, p. 277—278. New York.
- Schilling, E. (1923): Ein Beitrag zur Physiologie der Verholzung und des Wundreizes. Jahrb. f. wiss. Bot. 62 : 528.
- Wise, L. E. (1946): Wood Chemistry. New York.

М. Спурный и З. Сладкий :

Применение флороглюциновой реакции при изучении одревеснения клеточных оболочек

1. Предположение, что повышающаяся интенсивность окраски флороглюциновой реакции соответствует большему содержанию лигнина, установленному гидролитическим путем, было проверено при изучении постепенного одревеснения клеточных оболочек первичного и вторичного волокон растения.

2. Окраска клеточных оболочек после Ф-реакции сравнивалась с цветной шкалой, где наименьшая найденная интенсивность была обозначена, как степень 0 и самая большая, как степень 4.

3. Лигнин в волокнах был обнаружен гидролитическим путем с 72% H_2SO_4 .

4. Как предполагалось, результаты обоих методов отличались друг от друга. Первое предположение не было подтверждено. Результаты изучения постепенной лигнификации первичных и вторичных пучков твердого лыка, приобретенных по степени окраски после Ф-реакции, показаны в таблице 1. Очевидно, что интенсивность окраски поднимается до времени уборки растений, то есть 28. 7. с повышающейся зрелостью растений интенсивность окраски понижается. Напротив того, результаты химических анализов лигнина из волокон растений, приведенных в таблице 2, показывают, что количество лигнина в клеточных оболочках твердого лыка в течение развития растений непрерывно поднимается.

Результаты этой работы подтверждают мнение многих авторов, которые приводят, что Ф-реакция является только ориентировочным испытанием к различению одревесневших и неодревесневших мембран. При изучении лигнина, если предполагать соразмерность окраски с содержанием лигнина, нельзя этот метод применять.

Институт физиологии растений университета в Брно.

M. Spurný a Z. Sládký:

The progressive lignification of the cell-walls as studied by means of the phloroglucin - HCl reaction (F reaction)

1. A supposition was made, that the increase of the colour-intensity after the F reaction will correspond to the higher contents of lignine as determined by means of the hydrolytic method.

In order to confirm it, the progressive lignification of the sclerenchymatic bast-fibers of *Abutilon avicennae* was studied by means of the two respective methods.

2. The colour intensity of the cell walls, as studied on the cross-sections of the plant-stems after the F reaction, was compared with a colour-scale, where the lowest colour intensity was marked as a 0 degree, the highest one, on the other hand, as a 4 degree.

3. To determine the lignine content hydrolysis with 72% sulfuric acid was employed.

4. As it was expected, the results obtained by means of the two respective methods differed considerably, the supposition (see point 1) was not confirmed. The results concerning the progress of lignification in the primary and secondary bundle of bast fibers (see fig. 1) as studied by means of the F reaction are summarized in the table 1; it appears, that the colour intensity, after the F reaction, increased in both bundles up to the date 28. 7.; than with increase of the plant maturity, the decrease of the colouring has been ascertained; chemical analysis, on the other hand, shown (tab. 2), that the

lignine content in both bundles increases irreversibly in relationship to the plants developement.

5. The results of this work confirm the opinion of many authors that the F reaction has a value as a helping test only to distinguish the woody and non-woody membranes; it is not possible to use it by the study of the lignification if we presuppose the proportion of the colouring with the content of the lignine.

Institute for Plant Physiology, Masaryk University, Brno, ČSR.