Wpływ barwników, stosowanych za życia, na charakter kinezy somatycznej

(Influence des colorants vitaux sur le caractère de la
cinèse somatique).

(Tablice X—XII).

Napisał

WŁADYSŁAW A. BECKER.

I. Wstęp.

Teoretyczne opracowanie zasad barwienia za życia, w związku z zagadnieniami przepuszczalności plasmy, znajdujemy w pracach Pfeffera 1886, Overtona 1900, Ruhlana 1908 i 1912, Bethe'go 1922, Höbera 1922; tam również zostały podane wykazy odnośnej literatury. Teorią barwienia za życia barwnikami zasadowymi, których wprowadzenie do histologii zawdzięczamy Ehrlichowi 1894, zajmują się: Fischel 1901, Nirenstein 1913, 19, Herzfeld 1917, Möllendorf 1918. Okazuje się, że i tu, jak przy użyciu barwników kwaśnych, barwienie może mieć charakter dyfuzyjny lub ziarnisty (Möllendorf 1918, 26). W związku z tem stoją zagadnienia, jakie części żywej komórki uległy zabarwieniu.

Sprawy te w stosunku do materiału roślinnego są omówione w pracach Meyera 1920, Vonwillera 1921, P. Dangeard'a 1923, Guilliermond'a i Mangelot'a 1926. Z nowszej literatury, zwłaszcza z tej, która zajmuje się barwieniem za życia plasmy i jądra, wymienić należy prace Küstera 1912, 1926, Gicklorna 1927, Albacha 1927, 28, Paltauf 1928.

Kwestja możliwości uzyskania zabarwienia plazmatycznych, czy jądrowych części żywej i zdrowej komórki wiąże się ściśle z zagadnieniem szkodliwego działania substancyj użytych do barwienia, bowiem najmniej trujące barwniki, za jakie się uważa czerwień obo-

jętną czy błękit metylenu (Schneider 1926), mogą być używane swobodnie tylko w pewnych określonych granicach. Trzeba, jak mówi Möllendorf 1926, dla każdego obiektu i każdego barwnika wyszukać pewne optimum barwienia, przy najłagodniejszym działaniu trującym. Osiąga się to przez stosowanie możliwie rozcieńczonych roztworów substancji barwiącej.

Według Pfeffera, błękit metylenu działa już trującą w koncentracji 0'001‰, według Wisselingh'a, *Spirogyra maxima* zamiera już po 24 godzinach w roztworze 0'0001‰, podczas gdy przy 0'00002‰ ustaje tylko jej wzrost (cyt. ze Schneidera). Do barwienia za życia nitek *Zygnema*, włośników *Hydrocharis*, czepeczka korzeniowego *Stratiotes* używał Pfeffer rozcieńczenia błękitu 1 cz. w 500.000 cz. wody. Pospolicie stosowane do barwienia różnych obiektów roztwory czerwieni obojętnej zawierają się w granicach od 1 na 10.000 wody do 1:100.000. Wszakże Dangeard 1923 operował stężeniami takimi, jak 1:1000 lub 1:5000, przyczem ostatnie dawało mu najpewniejsze i najlepsze wyniki.

Obok doboru odpowiedniej koncentracji liczyć się musimy z czystością barwnika i wiekiem jego roztworu. Möllendorf 1926 stwierdził, że roztwory błękitu trypanowego 1:5000, używane przezeń do barwienia miętusów, nie mogły stać dłużej, jak 4—6 tygodni, po tym bowiem czasie nabierały silnych własności trujących¹⁾. Światło słoneczne i wyższa temperatura sprzyjają rozkładowi tego barwnika.

Dopatrywano się szkodliwego działania barwników silnie przez komórkę absorbowanych w mechanicznym jakby przeładowaniu komórki, co osłabia jej funkcje życiowe. Możliwość tę wysunął Fischel 1901, mając na uwadze nadmierne gromadzenie przez komórkę w jej wakuolach czerwieni obojętnej. Stanowisko to zwalcza Politzer 1924. Barwniki fluoryzujące stanowią pod względem szkodliwości osobną grupę. Trujące własności chemiczne będą się tutaj kombinowały z działaniem fotodynamicznym; wskazał już na to Tappeiner w r. 1899. *Paramaecia*, hodowane przez niego w możliwych do życia roztworach eozyny, żyły w ciemności, ginęły zaś szybko po naświetleniu eozynowanej kultury. Do rzędu barwników działających fotodynamicznie, zalicza Tappeiner czerwień obojętną i błękit metylenu (Tappeiner i Jodlbauer 1904; cyt. według Politzera 1924). Te zależności potwierdzili w roku 1923 Bohm i Drzewina,

¹⁾ Wzmianki o mniejszej lub większej toksyczności barwnika (w danym razie czerwieni obojętnej i błękitu metylenowego), w zależności od sposobu jego fabrykacji mamy w pracach Frazera 1920, Cowdry'ego 1928.

a w 1925 A. I. i W. W. Efimoff osłabiają szkodliwe fotodynamiczne działanie czerwieni i błękitu przez dodanie do kultur białka.

Celem mojej pracy było zorientowanie się, z jakimi zmianami i zaburzeniami morfologicznymi liczyć się musimy, przy użyciu do badań za życia czerwieni obojętnej i błękitu metylenowego, a w szczególności, jaki jest wpływ omawianych barwników na przebieg mitozy somatycznej. Za punkt wyjścia posłużyła mi praca Politzera z roku 1924. Autor, barwiąc za życia larwy salamandry czerwienią obojętną, a więc barwnikiem, uchodzącym za najmniej szkodliwy, zauważył w rozwoju larw zaburzenia, zależne od zjawisk anormalnego podziału jąder (pseudoamitozy, Haecker 1900).

II. Doświadczenia z czerwienią obojętną.

Politzer we wspomnianej pracy z r. 1924 używał roztworu czerwieni 1:150.000, traktując nim larwy salamandry w ciągu 2 godzin. Hodowane przeze mnie w roztworach tego barwnika 1:150.000, 1:100.000, 1:50.000, 1:20.000 korzonki *Allium Cepa*, *Stratiotes*, *Hydrocharis* i kielki *Nuphar* rozwijały się normalnie, nie wykazując żadnych nieprawidłowych figur podziałowych, pomimo bardzo intensywnego barwienia się wakuol. Obserwowałem jeszcze, zmniejszając stale rozcieńczenie barwnika, zachowanie się korzonków *Allium* w roztworach 1:500, 1:1000, 1:3000, 1:5000. Cebula była pędzona danym roztworem, a wyrosłe w barwniku korzonki utrzymywałem w miarę ich zjawiania się, t. j. w okresie czasu od 24—72 g.

Mimo kilkakrotnego powtarzania doświadczeń, nie udało mi się uchwycić momentu, w którym wpływ powyżej wskazanych roztworów odbijałby się na przebiegu mitozy somatycznej. Wszystkie figury mitotyczne należało zaliczyć do normalnych, aczkolwiek przy rozcieńczeniach takich, jak 1:500, czy 1:1000 wzrost korzonków silnie był zahamowany (zamierały wkrótce po wyrośnięciu z piętki), a ilość mitoz minimalna. Doświadczenia z błękitem metylenu dały wyniki pod powyższymi względami efektowniejsze.

III. Doświadczenia z błękitem metylenu.

A. Materiały i metody.

Silne rozcieńczenia błękitu (Grübler), takie jak 1:500.000, 1:150.000, 1:100.000, 1:50.000 pozostawały bez wyraźnego wpływu na rozwój korzonków. Użyłem przeto rozcieńczeń mniejszych, a mianowicie 1:500, 1:1000, 1:3000, 1:5000, 1:10.000. W związku z tem

stał wybór rośliny, użytej do doświadczeń. Poprzednie kultury z czerwienią obojętną wykazały, że operowanie roślinami wodnymi, takimi jak *Stratiotes* czy *Hydrocharis*, nasuwało trudności natury technicznej ze względu na wielkość obiektu i stosunkowo silne stężenie barwnika. Zasadniczą przeto część doświadczeń przeprowadziłem z grochem i cebulą, hodowanymi w kulturach wodnych. Z nich cebula okazała się materiałem o wiele wdzięczniejszym i wygodniejszym od grochu. Barwiłem jeszcze błękitem kielki *Nuphar* i nici plemnikowe *Chara contraria*, pragnąc mieć wśród obserwacji swoich rośliny, których naturalnem środowiskiem byłaby woda.

Doświadczeń pierwszej serii (a) z cebulą było cztery, według następującego schematu:

- Dośw. I. Barwnik rozpuszczony w wodzie destylowanej;
roztwory: 1) 1:500, 2) 1:1000, 3) 1:3000, 4) 1:5000, 5) woda dest.
- Dośw. II. Barwnik rozp. w zwykłej wodociągowej wodzie;
roztwory: 1) 1:500, 1:1000, 3) 1:3000, 4) 1:5000, 5) 1:10.000, 6) woda dest., 7) woda zwykła.
- Dośw. III. Barwnik rozp. w wodzie zwykłej;
roztwory: 1) 1:1000, 2) 1:3000, 3) 1:5000, 4) 1:10.000, 5) woda zwykła.
- Dośw. IV. Barwnik rozp. w wodzie zwykłej i destylowanej;
roztwory: 1) 1:500 woda zwykła, 2) 1:1000 w. zw., 3) 1:3000 w. zw.,
4) 1:5000 w. zw., 5) 1:500 woda destylowana, 6) 1:1000 w. dest.,
7) 1:3000 w. dest., 8) 1:5000 w. dest., 9) woda zwykła, 10) woda dest.

Cebule były pędzone w roztworach błękitu w słojach różnej wielkości, ze szkła białego, zwykłego. W dośw. I roztwory barwnika były przygotowane w wodzie destylowanej. Obok tego, dla kontroli, pędzono cebulę czystą destylowaną wodą.

W dośw. II, gdzie barwnik, dla zestawienia z dośw. I rozpuszczony był w wodzie zwykłej, kultura kontrolna składała się z wody destylowanej i zwykłej. Nie zauważyłem żadnych wybitnych jakościowych ani ilościowych różnic w zachowaniu się rośliny w I i II-gim roztworze, przeto doświadczenie III było tylko powtórzeniem II-go. W ostatniem, IV dośw. tej serii, raz jeszcze zestawiałem omawiane roztwory.

Doświadczenia II, III i IV robiono w szklarni przy temp. 18°—22° C. W doświadczeniu III (25. I. 1928) temperatura ta uległa raz silniejszym wahaniom, spadając podczas nocy do 12 C°. W temże doświadczeniu, mając do czynienia z cebulą świeżą, która się nie dawała tak łatwo pędzić wodą, stosowałem metodę *Schae'dego*, zlekka ścinając piętke stycznem cięciem (*Schae'de* 1927). Metoda ta dawała wyniki dobre. Ilość wypuszczonych przez cebulę korzonków była dość znaczna.

Do każdego doświadczenia barwnik był świeżo przygotowywany. Ponadto stwierdzamy, już przy zwykłym pędzeniu cebuli w czystej wodzie, wydzielanie się pewnych substancji, zabarwiających wodę na żółto. Po zastosowaniu metody Schae'de'go (dośw. III) wydzielanie tych soków było bezwzględnie intensywniejsze, przeto zmieniałem barwnik co 6 godzin w dzień i co 12 godzin, gdy w rachubę wchodziła noc, dla uniknięcia ewentualnych komplikacji, płynących z możliwych zmian chemicznych samego roztworu. Próby pędzenia cebuli w roztworach błękitu, stojące poza nawiasem omawianych czterech doświadczeń, wykazywały, że przy pozostawieniu rośliny na dłuższy okres czasu w barwniku, ten ostatni wytrącał się z roztworu, woda zaś miała barwę brudno-zieloną, przejmując charakterystyczny zapach cebuli.

Korzonki utrwalalem w mieszaninie Bouin'a (por. Politzer 1924), część zaś dla porównania (dośw. IV) płynem Flemminga. Czas utrwalania z konieczności rzeczy musiałem uzależnić od czasu zjawiania się korzonków, ponieważ w roztworach 1:500 i 1:1000 i po 24—36 godzin nie było ich śladu. W innych zjawiały się mniej lub więcej obficie. Z drugiej strony pozostawienie małych, ledwie wyrosłych korzonków na czas dłuższy (do 12 godz.) w barwniku, skazywało je na zamarcie.

Okres czasu, w ciągu którego korzonki były utrwalane, wahał się w granicach 24—48 godz., poczynszyszy od chwili nastawienia cebuli. Z roztworów 1:500 i 1:1000 brałem korzonki nawet po upływie 72 godz., a to dlatego, że niekiedy zjawiały się one dopiero po tym okresie czasu. Długość utrwalanych korzonków wynosiła 1·3 mm.

Skrawki grubości ± 7 i 10 μ barwiłem hematoksyliną żelazową Heidenhein'a, lub safraniną z zielenią jasną. Z otrzymanego w ten sposób materiału przejrzałem dokładnie kilka tysięcy skrawków, około 200 korzeni.

B. Opis rezultatów, otrzymanych u *Allium Cepa*.

1. Spostrzeżenia ogólne. Odręczne przekroje korzonków, robione brzytwą i oglądane w zwykłej wodzie lub oleju parafinowym, wykazywały silne zabarwienie wakuol w komórkach skórki i paru warstwach, leżących poniżej. Dalej następował pas o zabarwieniu znacznie słabszym, a czasem nawet zupełnie bezbarwny. Po nim znowu pasmo z kilku warstw niebieskich, wreszcie warstwa o słabszym zabarwieniu, granicząca z endodermą. Komórki tej ostatniej zawsze się charakteryzowały silnymi strąceniami barwnika. Temu schematowi odpowiadał całkowicie układ warstw zabarwionych, ob-

serwowany na przekrojach podłużnych. Na tych przekrojach, szukając nieprawidłowych figur podziału mitotycznego (materiał utrwalony), nie zauważyłem żadnych wybitnych różnic w zachowaniu się komórek epidermy, periblemy czy pleromy. Spotykałem równie często we wszystkich wspomnianych warstwach podziały komórkowe zarówno normalne, jak i z objawami patologicznymi. Poszczególne komórki jednej warstwy zachowywały się rozmaicie. Nie spostrzegłem też wyraźnych różnic w zachowaniu się roślin w roztworach błękitu, sporządzonych w wodzie zwykłej czy destylowanej. Cebula przez czas zakreślony doświadczeniem dawała się pędzić równie dobrze wodą destylowaną i zwykłą, aczkolwiek Yamah'a 1927 stwierdził zupełne zatrzymanie podziałów w korzeniach *Vicia faba*, trzymanych 24 godz. w wodzie destylowanej.

Rozcieńczenie 3000 razy okazało się najdogodniejszym do obserwowania przebiegu zaburzeń w kinezie, a to dla stosunkowo dużej ilości podziałów wogóle i znacznej w tej części podziałów nieprawidłowych. Rozcieńczenie 5000-krotne dawało wyniki dobre. W rozcieńczeniu 10.000 razy obserwowałem tu i ówdzie obrazy nieprawidłowe, najczęściej jako zwykłe zlepianie chromosomów anafazowych. Naogół można powiedzieć, że przy 10.000 podziały były normalne. Jeśli chodzi o znajdowanie nienormalności, to przy rozcieńczeniu 500 razy wyniki były również dobre. Korzonki jednak szybko zamierały, całą więc trudność przedstawiało tu uchwycenie momentu podziałów i mała ich liczba. Najgorsze wyniki miałem zawsze z hodowli w roztworze 1:1000. W tym rozcieńczeniu korzonki rosły źle, przyczem liczba podziałów prawidłowych była bezsprzecznie większa od liczby nienormalnych.

2. Spostrzeżenia nad kinezą. a) Przy przeglądzie nienormalności kinezy, wywołanych błękitem metylenu w doświadczeniach I, II, III i IV serji pierwszej (a), odrzucić musimy wyróżnianie tu pierwotnego i wtórnego efektu¹⁾ działania barwnika, gdyż w doświadczeniach tych korzonki od samego początku rosły w roztworze barwnika, nie były zaś poddawane jego działaniu dopiero w pewnej fazie swego wzrostu.

W zachowaniu się jąder profazowych nie mogłem stwierdzić nic takiego, coby rzucało się w oczy, jako typowa nienormalność morfologiczna. Przeważały profazy (pora utrwalania mat. we wszystkich

¹⁾ Istnienie tych dwóch efektów, podkreślone przez Alberti'ego i Politzer'a w r. 1924, brane jest pod uwagę w nowych pracach, tych mianowicie, gdzie chodzi o patologię komórkową, wywołaną promieniami Roentgena (Rochlin i Gleichgewicht 1925, Bersa 1927, Pekarek 1927).

doświadczeniach godz. 10—12 rano), a w wielu skrawkach prócz nich nie spotykało się żadnej innej figury.

Dopiero poczynawszy od metafazy obserwowałem wyraźne zniekształcenie typowych figur podziałowych. Niejednokrotnie, w rozcieńczeniu 1 : 500 chromosomy, po zaniku błony jądrowej, leżą stłoczone w środku komórki, a z ogólnej zbitej masy karjotynowej tylko tu i ówdzie sterczą ich końce (por. Pekarek 1927). W wypadkach krańcowych mamy do czynienia z bezkształtną, kleksowatą masą silnie zabarwionej substancji karjotynowej (ryc. 1). W razie mniej posuniętych zmian patologicznych można wyróżnić chromosomy jako takie (ryc. 2).

Jeśli w roztworze 1 : 500 mieliśmy przeważnie metafazy bardzo zniekształcone, obok prawie normalnych, to w rozcieńczeniach 1000, 3000, 5000 i 10.000 razy bez trudności znajdujemy typy przejściowe o chromosomach mniej lub więcej zdeformowanych, rozlanych, poprzewężanych. Spotyka się ślady całkowitego lub połowicznego wrzeciona (ryc. 3, 5, 6) Czasem dokoła w plasmie leżą kropelki, barwiące się czarno hematoksyliną. W roztworach 1 : 3000 i 1 : 5000 spotykałem grupy chromosomów metafazowych, jakby w rekonstrukcji wstecznej, „eingruppierte Rekonstruktion“ Sakamura'y (1920) (ryc. 4). Autor określa tą nazwą zarówno skupienie normalnie wykształconych chromosomów w rekonstruującym się jądrze, jak i leżącą pośrodku komórki zwakuolizowaną masę substancji jądrowej. Pochodzenie tej to masy wyprowadza ze zlania się chromosomów w stanie daleko posuniętej ich dezorganizacji. Nie zdaje mi się wszakże, aby przez rekonstrukcję jąder z jednego i drugiego rodzaju utworów powstać miały elementy równowarte. Z normalnych, a tylko bezładnie rozproszonych chromosomów spodziewać się możemy jądra żywotnego i bisomatycznego (analog. „Restitutionskerne“ Rosenberga 1927), podczas kiedy z rozlanej masy karjotyny trudno otrzymać coś naprawdę zdrowego i zdolnego do życia. Otrzymane przeze mnie, nieliczne zresztą obrazy takiej metafazowej jednogrupowej rekonstrukcji należy właśnie zaliczyć do tej ostatniej kategorii i należałoby tu raczej mówić o rozlewaniu się czy też rozpuszczaniu chromosomów (Oes 1908). Jeśli jednak weźmiemy pod uwagę możliwość wytworzenia się z podobnych grup jąder nieregularnych, amebowato rozlanych (ryc. 5), dalszego losu tychże należałoby upatrywać w postępowaniu procesu karjo- i chromatolizy (dla promieni Roentgena i Ra Körnicke 1905, Komuro 1922; literatura karjolizy Tischler 1921/22 i Ernst 1915).

Jako dalsze stadium tylko co opisywanych pseudo-metafaz i przejście ich do pseudo-anafazy (Regemorter 1926/27) możemy uważać figury, występujące we wszystkich stężeniach barwnika. Na rzeczonych figurach pozlepiane chromosomy, lub wogóle karjotyna wykazują jakby usiłowanie rozgrupowania bicentrycznego. Dążność ta uwidacznia się specjalnem ułożeniem substancji jądrowych w kierunku pewnych smug plazmy, będących zapewne resztkami wrzeciona (ryc. 6, 7, 8). Powyciągane wąziutkie niteczki substancji karjotynowej wyraźnie zaznaczają kierunek sił atrakcyjnych (podług Mervesa cytując z Politzera 1924).

Gdy proces rozdzielania karjotyny postępuje dalej, jesteśmy świadkami nieprawidłowych anafaz, które nieraz trudno tą nazwą określić. Jest to poprostu rozrywanie grupy karjotynowej na dwie części (ryc. 8, 9, 10, 11, 12, 13). Tylko w tych wypadkach, w których konsolidacja chromosomów była wyraźniejszą, możemy mówić o ich zlepianiu się i zapóźnionej wędrówce do biegunów (ryc. 14).

W rezultacie otrzymujemy dwie postrzępione masy karjotyny, połączone odnogami w mniejszym lub większym stopniu.

Tego rodzaju anafazy tłumaczą nam występowanie nienormalnych obrazów telofazowych. Te ostatnie polegają na rekonstrukcji jąder pochodnych, połączonych pasmami karjotyny resp. chromosomami.

W zależności od tego, czy mostki, łączące jądra są silnie rozwinięte, czy też dają się rozpoznać jako pojedyncze, zlepione chromosomy, możnaby mówić albo o telofazalnej „eingruppige Rekonstruktion“, albo o dwu jądrach telofazowych, połączonych mostkami z pozlepianych chromosomów (por. Politzer 1924). Trudne jest postawienie granicy między temi typami. Mostki te mogą być mniej lub więcej szerokie, mogą się zlewać w większe pasma, cieńsze zaś ulegają przerwaniu, o czym świadczą strzępki, wiszące u jąder (ryc. 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22).

Powyższe sprawy komplikują się jeszcze w zależności od występowania wrzeciona cytokinezy i zawiązka błony podziałowej, która oczywiście nie bywa pełną, jak długo pozlepiana karjotyna łączy jądra pochodne. Komplikacje te widzimy i w dalszych stadiach kinezy: spotykamy komórki (1 : 500, 1 : 3000, 1 : 5000), w których, dzięki istnieniu mniej lub więcej nieforemnych jąder, błona już wykształcona jest niepełna i przylegając jednym końcem do ściany komórki macierzystej, wcina się tylko w plasmę na pewną nieznaczną odległość (ryc. 23, 24, 25). W wypadku, przedstawionym na rycinie 26, błona zajęła cały przekrój komórki, zostawiając tylko okienko, w którym tkwi hantlowate jądro.

Jako ostateczny efekt tych dwu czynności, t. j. podziału karjotyny i tworzenia błony, otrzymujemy następujące możliwości:

1) strzępki karjotynowe, lub pozlepiane chromosomy rozdziela się na dwie grupy pochodne, przyczem wykształci się błona podziałowa. Te dwie czynności doprowadzą do podzielenia się komórki na dwie pochodne. Obrazy takie są b. częste, zwłaszcza w roztworach 1:5000 i 1:10.000, a wrzeczona cytokinezy wykształcają się zazwyczaj dobrze (ryc. 19, 20).

2) strzępki karjotyny lub pozlepiane chromosomy rozerwą się, wytwarzając grupy pochodne, ale błona się nie wykształci, lub też będzie niepełna. Powstaną komórki dwujądrowe (ryc. 27, 28).

3) pasma karjotyny, czy pozlepiane chromosomy nie utworzą grup pochodnych, a wówczas błona podziałowa siłą rzeczy nie przecnie całej komórki. W tych wypadkach wrzeczono wykształci się częściowo, lub też brak go będzie zupełnie. Ten bieg rzeczy prowadzi do powstania jąder najrozmaitszych kształtów: klepsydrowatych, hantlowatych, lub wogóle nieregularnych (ryc. 21, 23, 24), przypominających często figury bezpośredniego podziału. Obok nich widać czasem ślady niepełnej błony.

Nie udało mi się znaleźć komórek bezjądrowych i tworzenia się błony niezależnie od karjokinezy, ani też jednoczesnego podziału komórki na szereg małych komórek, posiadających jądra. Nie widziałem nigdzie rekonstrukcji poszczególnych chromosomów w jądra karłowate, choć tu i ówdzie można było spotkać ułamki chromosomu, porzucone w plasmie. W takich razach preparaty wskazywały raczej na ziarnistą degenerację tych utworów (ryc. 29, 30, 31).

W anafazie i głównie we wczesnych stadiach telofazy występuję w plasmie wiele porzrzucanych pozajądrowych jąder. Istnienie tych ostatnich, notowane zresztą nie tylko w wypadkach patologicznej mitozy, daje się stwierdzić niekiedy już w metafazie. Ciałka te obserwował Sabline 1903. Sakamura (1920) opisuje je dość pobieżnie, a Regemorter (1926/27) poświęca im osobny rozdział swej pracy, nazywając całe zjawisko „liquefaction de la chromatine“.

Jak widać z powyższego, jądra powstałe drogą opisywanych procesów, wykazują wielką różnorodność form. Różnorodność ta zależy od stopnia rozejścia się na bieguny substancji karjotynowej resp. chromosomów i od okresu wystąpienia rekonstrukcji wstecznej. Jądra bądź poprzewężane, bądź też kształtu hantlowatego, interesujące nas ze względu na zagadnienie amitozy, dają się wszystkie, jak na to wskazują ryciny 25, 30, 31, 32, z łatwością wywieść z „eingruppige Rekonstruktion“ elementów podziału mitotycznego. Jeden z takich

obrazów (ryc. 33), imitujący do pewnego stopnia djaspazę, ma na boku górnej półkuli maleńki dziobek, który chyba trudno inaczej interpretować, jak tylko jako pozostałość po przerwanej niteczce karjotynowej. W tym przeto wypadku nie można chyba mówić bez zastrzeżeń o prostym przewężaniu się jądra. Co się tyczy jąderek, to tylko jeden raz widziałem ich przewężanie się, ale i tu nie może ono świadczyć na korzyść podziału prostego, gdyż w obrębie jądra dają się wyróżnić wiszące strzępki karjotyny (ryc. 34).

b) Celem prób, robionych w drugiej serii doświadczeń, było zapoznanie się z dalszym losem nieregularnych jąder, względnie komórek dwujądrowych, oraz w miarę możliwości sprawdzenie, czy pewne obrazy, podobne do amitotycznych nie dadzą się wytłumaczyć jako zlewanie się dwu jąder, istniejących w jednej komórce. Obok tego nasuwała się możliwość wywołania i wyróżnienia działania wtórnego obok pierwotnego.

Odpowiednie doświadczenia powtarzałem dwa razy: cebulę, która wydała korzonki w roztworach błękitu 1 : 3000 i 1 : 5000 przenosiłem do czystej wody. Materiał utrwaliałem po 2, 4, 6, 12, 20 i 24-godzinym pobycie w wodzie. Obrazy, otrzymane na preparatach utrwalonych po 2, 4, 6 godz. zasadniczo nie różniły się niczem od stanu korzonków w barwniku (dośw. I, II, III, IV). Tak samo występują tu nienormalne metafazy, anafazy z pozlepianiami chromosomami i telofazy z mostkami karjotynowymi. Wrzeczono wykształcone jest mniej lub więcej wyraźnie, zawiązek błony podziałowej zachowuje się analogicznie. Tu i ówdzie występują niekształtne, rozlane jądra, bardzo mało odcinające się od plasmy, co potwierdzałoby omawiany poprzednio proces karjo-chromatolizy. Po 12-godzinym pobycie w wodzie spotyka się jeszcze zlepianie chromosomów anafazowych, lub mostki w telofazie. Są one jednak coraz radsze, by po 20 i 24 godz. stanowić tylko sporadyczne wypadki. Reszta podziałów jest normalna. Co się tyczy dalszych losów komórek dwujądrowych, nie znalazłem definitywnej odpowiedzi, bo nie widziałem momentów, przemawiających za zlewaniem się jąder, ani też nie spotkałem nigdzie płyt bisomatycznych. Figurę, przedstawioną na ryc. 33 uważam raczej za jednogrupową rekonstrukcję, nie zaś za zlewanie się jąder, gdyż wszystkie otrzymane przeze mnie komórki dwujądrowe, wykazywały jądra bardzo blisko siebie leżące, czego nie można powiedzieć w stosunku do omawianej ryciny. Warto wreszcie zaznaczyć, iż Němec, badając w 1903 r. wpływ chloralhydratu na korzonki *Vicia*, *Pisum* i *Allium*, spostrzegł, że komórki dwujądrowe u *Allium* występują bardzo rzadko, oraz stwierdził niezlewanie się

w nich jąder, a tylko ich wzajemne ku sobie zbliżenie. Na moich preparatach otrzymanych z błękitu met. sprawa przedstawia się zupełnie analogicznie.

c) W drugiej serii doświadczeń (b) nie udało mi się wyróżnić obok siebie dwu morfologicznych typów nienormalnego przebiegu mitozy, typów, któreby się dały wytłumaczyć jako efekt pierwotny i wtórny. Wobec tego robiłem jeszcze z cebulą próby, będące modyfikacją doświadczeń serii drugiej.

Korzonki cebuli, wyrosłe w wodzie czystej, przenosiłem do roztworów barwnika. Operowałem tu stężeniami 1:500 i 1:3000. Materiał utrwalalem po 3-godzinym pobycie w roztworze błękitu, gdyż doświadczenie wykazało, że dłuższy pobyt rośliny w tych warunkach hamuje prawie zupełnie podziały, zabijając korzonek. We wszystkich preparatach, otrzymanych z tej serii doświadczeń, figury anormalnych podziałów niczem zasadniczo nie różniły się od przejawów patologicznych poprzednio już opisywanych. Jedynym typem nienormalności było znowu zlepianie się i zlewianie chromosomów.

d) Liczby, które podaję niżej, dla ilościowego przedstawienia stosunków panujących w korzonkach cebuli, poddanych działaniu błękitu metylenowego (dośw. serii „a”), mają tylko znaczenie względne z powodu pewnej dowolności w stawianiu granicy między tem, co jest „normalne”, a tem, co „nienormalne”. Dotyczy to zwłaszcza metafazy, gdzie, jak wspomniałem, istnieją przejścia i stopniowanie w patologii figur podziałowych. Jako metafazy normalne liczyłem już te, które miały chromosomy dokładniej wykształcone, co zresztą nie przeszkadzało im by były pozlepiane. (Patrz tabela I, przeniesiona na stronę następną).

Powyższe dane ilustrują odmienne jakby zachowanie się roztworu 1:1000, w stosunku do innych stężeń barwnika i stosunkowo małą liczbę figur telofazowych (czas utr. godz. 10—12 rano). Osobną rubrykę poświęciłem obrazom jąder, lepiej naśladujących figury bezpośredniego podziału.

C. Rezultaty otrzymane na innym materiale.

W celu rozszerzenia ram mych doświadczeń, hodowałem jeszcze w warunkach podanych wyżej korzenie grochu, jęczmienia, kielki *Nuphar* i nici plemnikowe *Chara contraria*. W korzonkach grochu i jęczmienia przy analogicznych stężeniach barwnika obserwowałem zlepianie się chromosomów i obecność mostków telofazowych. Materiał ten okazał się jednak bardzo wrażliwym i korzonki szybko zamierały. Przebieg doświadczeń z wyżej wymienionymi roślinami

Tabela I.

Solutions du bleu de met.		1 : 500	1 : 1000	1 : 3000	1 : 5000
Nombre de prepa- rations examin.		21	30	26	26
Nombre de coupes examin.		> 1000	> 1000	> 1543	< 1000
Nombre de prophases		1058	651	3737	2793
Nombre de metaphases	norm.	102	296	297	558
	anorm.	301	169	921	790
	% anorm.	74·7	36·3	75·6	58·6
Nombre d'anaphases	norm.	26	135	69	272
	anorm.	73	53	214	219
	% anorm.	73·7	28·2	75·6	44·6
Nombre de telophases	norm.	41	85	133	457
	anorm.	45	50	184	182
	% anorm.	52·3	37	58	28·4
Nombre de noyaux pseudoamitotiques		14	3	45	49

odpowiadał ostatnim doświadczeniom z cebulą. Roślinki, wyrosłe w zwykłej wodzie, przenosiłem do barwnika — efekt był analogiczny.

Kielki *Nuphar* nie reagowały wcale na stężenia błękitu: 1 : 100, 1 : 500, 1 : 1000, barwiąc się mało nawet i po 24 godzinach. Nienormalności, spotykane w niciach plemnikowych *Chara*, należały do typów już opisanych.

Streszczenie wyników.

1. Objekty roślinne, używane do doświadczeń z czerwienią obojętną i błękitem metylenu, okazały się mniej wrażliwymi na szkodliwe działanie tych barwników, niż badane przez Politzera ze względu na czerwień, larwy salamander.

2. Pospolicie używane do badań za życia, silnie rozcieńczone roztwory czerwieni ob. i błękitu met. pozostają bez wpływu na przebieg mitozy w korzonkach cebuli, *Stratiotes* i *Hydrocharis*, rosnących w tych roztworach.

3. Silniejsze stężenia błękitu met. (1:500, 1:1000, 1:3000, 1:5000, 1:10.000) wywołują u cebuli pędzonej temi roztworami zaburzenia w podziałach komórkowych, kończące się zamarciem korzenia.

4. Morfologiczny charakter tych nienormalności niczem zasadniczo nie różni się od zaburzeń, wywoływanych w komórkach roślinnych, czy zwierzęcych przez działanie na nie innymi szkodliwymi czynnikami, jako to narkotyki, różne trucizny, gaz świetlny, niska czy wysoka temperatura, promienie Roentgena, radu, czy też katodowe.

Pracę tę wykonałem w Zakładzie Botaniki Ogólnej U. W. Uważam za swój obowiązek złożyć wyrazy głębokiej wdzięczności kierownikowi tego Zakładu p. prof. Z. Wóycickiemu za wskazówki i najdalej idącą pomoc, jakich mi nigdy nie szczędził. Dziękuję również serdecznie p. Dr. Wałek-Czarneckiej za rady i interesowanie się biegiem pracy.

Literatura.

- 1) Efimoff, A. i W. W. Biochem. Zeitschr. 155, 1925.
- 2) Ehrlich, P. Allg. med. Zentralztg., 1894.
- 3) Ernst, P. Handbuch d. allg. Path. B. III, A. I., 1915.
- 4) Fischel, A. Anat. Hefte B. 16, A. I., 1901.
- 5) Guilliermond, A. i Mangenot, G. Rev. gen. de bot. 38, 1926.
- 6) Höber, R. Phys. Chem. d. Zelle u. Gewebe, 1922.
- 7) Komuro, H. Bot. Mag. 36, 1922.
- 8) Küster, E. Zeitschr. f. wiss. Mikr. B. 44, H. 3, 1926.
- 9) Möllendorf. Encykl. d. Mikr. Techn., 1926.
- 10) Němec, B. Das Problem der Befrucht, 1910.
- 11) Paltauf, A. Sitzber. Akad. wiss. Wien. B. 137, H. 9.
- 12) Politzer, G. Zeitschr. f. Z. u. Gewebelehre. B. I, H. V, 1924.
- 13) Regemorter, D. La Cellule 37, 1926/27.
- 14) Rosenberg, O. Hereditas VIII, 1927.
- 15) Sakamura, T. Journ. of the Coll. of Sc. Imp. Univ. Tokyo. V. 39, Art. 11., 1920.
- 16) Schneider, G. Encykl. d. Mikr. Techn, 1926.
- 17) Tischler, G. Allg. Pflanzenkaryologie, 1921/22.
- 18) Vonwiller. Abderhald. Handb. Abt. V, T. 2.
- 19) Yamaha, G. Journ. of the F. of Sc. Imp. Univ. Tokyo. V. II, P. I, 1927.

Objaśnienie tablic X—XII.

Rysunki wyk. przy zast. ap. rys. Abbego, homog. immersji Reicherta 1/12 i ok. Nr. 15 Zeissa. Powiększenie około 1400 razy. Wszystkie komórki z korzonków cebuli; utrwalacz — płyn Bouin'a, barw. hemat. żelazową.

Ryć. 1 i 2. Korzonek wyrosły w roztworze błękitu met. 1:500; obydwie komórki z periblemą. Nienormalne metafazy, zlepianie się i zlewianie chromosomów w jednolitą masę karjotyny.

Ryć. 3. 1:5000 dermatogen; chromosomy metafazowe poprzewężane, porozlewane, z obu stron ślady wrzeciona; w plasmie pozajądrowe jąderka.

Ryć. 4. 1:3000 dermatogen; „eingruppige Rekonstruktion“ chromosomów o ułożeniu metafazowem.

Ryć. 5. 1:5000 periblema; nienormalna metafaza z rozlaniami chromosomami, jądro spoczynkowe i jądro nieregularne, amebowate, powstałe przez rekonstrukcję grupy karjotynowej.

Ryć. 6. 1:5000 periblema; nienormalna metafaza: karjotyna rozmazana w kierunku wrzeciona.

Ryć. 7. 1:5000 dermatogen; niteczki chromatyny powyciągane z grupy metafazowej w kier. jednego z biegunów; ślady wrzeciona jak na ryć. 6.

Ryć. 8, 9, 10. 1:3000 dermatogen; 1:1000 periblema; 1:3000 dermatogen; pseudo-anafazy; rozrywanie karjotyny.

Ryć. 11, 12, 13. 1:5000 periblema; 1:1000 dermatogen; 1:1000 periblema; rozrywana bicentrycznie karjotynowa subst. przestaje barwić się intensywnie hematoksyliną.

Ryć. 14. 1:5000 dermatogen; zlepianie się chromosomów anafazowych; pośrodku grup chrom. plasma w postaci wrzeciona; zarysowuje się zaczątek błony podziałowej.

Ryć. 15. 1:5000 dermatogen; późna anafaza dwu mas karjotynowych.

Ryć. 16. 1:5000 pleroma; telofazowe jądra połączone mostkiem; wrzeciono i błona wyraźne.

Ryć. 17. 1:3000 dermatogen; „eingruppige Rekonstr.“ anafazowej grupy karjotyny; mostki w postaci szerokiego pasa i cienkich nitek.

Ryć. 18. 1:500 dermatogen; dwa telofazowe jądra, połączone mostkiem; brak błony podziałowej.

Ryć. 19, 20. 1:3000 pleroma; jądra telofazowe z wiszącymi strzępkami, po przerwanych niteczkach karjotyny; błona podziałowa wykształca się normalnie.

Ryć. 21, 22. 1:5000 periblema; 1:3000 dermatogen; jednogrupowa rekonstrukcja grupy anafazowej, bez wytworzenia błony podziałowej; w plasmie pozajądrowe jąderka.

Ryć. 23. 1:3000 dermatogen, kom. dolna przedstawia rekonstrukcję grupy anafazowej, jaką widać w kom. górnej; częściowa błona; w plasmie pozajądrowe jąderka.

Ryć. 24, 25. 1:5000 periblema; 1:3000 dermatogen; pseudoamitotyczne postacie jąder, powstałe drogą rekonstrukcji pozlepianych grup pochodnych; niepełne błony podziałowe.

Ryć. 26. 1:10.000 periblema; błona podziałowa zajęła cały przekrój komórki, zostawiając tylko w środku otwór, przez który przeciska się wydłużone jądro.

Ryć. 27, 28. 1:5000 dermo-periblema; 1:5000 periblema; komórki dwujądrowe; jądra leżą blisko siebie, nie wykazując jednak tendencji do zlewania się.

Ryć. 29. 1:3000 dermatogen; telofazowe jądra połączone mostkiem z chromosomu; w plasmie leży ułamek chromosomu, wykazujący ziarnistą degenerację.

Ryć. 30, 31, 32, 33. 1:500 dermatogen; 1:500 periblema; 1:500 periblema; 1:5000 periblema; różne formy jąder pseudoamitotycznych; w plasmie pozajądrowe jąderka, lub ułamki ziarnisto degenerującego chromosomu; taki sam rozpad chromosomów i w obrębie jąder.

Ryć. 34. 1:3000 pleroma; pseudoamitoza z przewężaniem się jąderka; nikły ślad niepełnej błony podziałowej.

Résumé.

Politzer a publié en 1924 un travail, concernant l'influence nocive du rouge neutre sur la caryocinèse des cellules épidermiques des larves de *Salamandra*. Ce travail a servi de point de départ à mes propres recherches concernant l'influence du rouge neutre et du bleu de méthylène sur le matériel végétal.

Les plantes telles que *Stratiotes*, *Hydrocharis* et les graines de *Nuphar* en germination furent placées dans les solutions du rouge à la concentration 1:150.000, 1:100.000, 1:50.000, 1:20.000, sans aucune influence visible de ce dernier sur le développement des racines, ni sur la marche des caryocinèses somatiques dans les tissus embryonnaires. Comme l'application de concentrations telles que 1:1000, 1:3000, 1:5000 de ces colorants à des plantes de grande taille constitua des difficultés d'ordre technique, j'eus recours aux objets tels que le pois et surtout l'oignon.

Malgré la répétition de mes expériences je n'ai pu saisir le juste moment, auquel l'influence du rouge neutre se manifeste dans le caractère de la mitose, bien que les solutions agissent mortellement sur les racines.

Les faibles concentrations du bleu de méthylène telles que 1:500.000, 1:150.000, 1:100.000, 1:50.000 n'avaient aucune influence visible sur les racines de l'oignon; tandis que les concentrations 1:1000, 1:3000, 1:5000, 1:10.000 m'ont permis d'observer la marche anormale de la caryocinèse.

Le caractère morphologique de ces perturbations ne différait en rien de celles, provoquées dans les cellules végétales ou animales par beaucoup d'autres agents: poisons, narcotiques, alcaloïdes, hydrate de chloral, gaz d'éclairage, vapeurs d'éther ou de chlorophorme, ou enfin par de tels agents comme de basses ou hautes températures, la plasmolyse, la centrifugation, les rayons de Roentgen, de radium ou les rayons cathodiques.

Dans la prophase, il n'y avait rien qui puisse attirer mon attention comme une anomalie morphologique typique.

C'est seulement à partir de la métaphase que j'ai pu constater la perturbation des figures typiques de la mitose. Elle consistait dans l'accollement et la fusion des chromosomes en masses plus ou moins régulières, passant en masses complètement informes (Fig. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8). Ces images, souvent rencontrées, dépendent de la concentration du colorant et peuvent constituer jusqu'à 75% d'éléments examinés (comp. I).

A la suite de ces pseudométaphases apparaissent des anaphases irrégulières qui font plutôt l'impression de la désagrégation simple de la caryotine (Fig. 8, 9, 10, 11, 12, 13). On peut parler de l'accollement des chromosomes anaphasiques et leur passage attardé vers les pôles, seulement dans le cas de leur faible dégénérescence (Fig. 14, 15). A la télophase les groupes anaphasiques de la caryotine donnent des noyaux plus ou moins irréguliers, tantôt rappelant les figures de la division amitotique (Fig. 16, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 29, 30, 31, 32, 33, 34).

Le procès de la fragmentation de la caryotine et de sa reconstruction télophasique peut être compliqué par l'apparition de la membrane de division, qui peut être entière, avec la distribution bicentrique de la caryotine (Fig. 19, 20), partielle (Fig. 23, 24, 25, 26, 30, 34), ou qui enfin peut faire complètement défaut. Cette dernière éventualité peut conduire à l'apparition des cellules binucléées (Fig. 27, 28). J'ai constaté l'existence de ces dernières dans les racines de l'oignon, poussant dans les solutions à 1:5000, ainsi que dans les racines qui, évoluées dans la solution à 1:3000, étaient fixées, après un passage de deux heures dans l'eau. Je n'ai pu trouver de réponse en ce qui concerne le sort de ces cellules binucléées, malgré que la possibilité de la fusion des ces noyaux soit exclue. Les plantules du pois, cultivés dans les solutions analogues de bleu de méthylène m'ont permis de constater l'accollement des chromosomes et les pseudoamitoses. Mais ce matériel ne m'a pas donné de résultats positifs à cause de l'arrêt des divisions et la mort des cellules.

Les anomalies pareilles à celles, que j'ai décrits pour l'oignon, ont été également observées dans les anthérides de *Chara contraria*, cultivée dans les solutions du b. de m., pareilles à celles, employées pour les racines de l'oignon.

Institut de Botanique Générale de l'Université de Varsovie.

23

24

27

25

28

29

30

31

26

33

32

34