Obserwacje przyżyciowe nad wpływem kinetyny na czas trwania niektórych stadiów mitozy.

Observations vitales de l'influence de la kinétine sur la durée des certains stades de la mitose

M. J. OLSZEWSKA

WSTĘP

Z szeregu prac wiadomo, że kinetyna (związek otrzymany przez Millera, Skooga i wsp., (1955) wzmacnia aktywność mitotyczną u roślin (Das i współprac. 1956, Guttman 1956, Olszewska 1958 i 1959 oraz Olszewska, Maciejewska-Potapczyk i Sempłowska 1957) i zwierząt (Ogawa i współprac. 1957, Guttman i Back 1958, Marczyński 1958). Przy próbach analizy sposobu działania kinetyny wylańa przede wszystkim pytanie, czy wpływa ona na czas trwania mitozy.

Wpływ kinetyny na czas trwania mitozy w merystemie korzeniowym cebuli był badany przez Guttman (1956) w toku jednej z pierwszych prac cytologicznych poświęconych działaniu tej substancji. Autorka ta badała materiał utrwalony. Uznała ona, że fakt występowania większej ilości mitoz w materiale poddanym działaniu kinetyny można zinterpretować dwojako: kinetyna bądź wydłuża czas trwania mitozy, bądź skraca okres interfazy. Materiał swój autorka poddała analizie statystycznej, z której wyników — zależnie od przyjętego założenia — równie dobrze można wyprowadzić wniosek, że kinetyna wydłuża czas trwania mitozy o 50% (przy niezmiennym okresie interfazy), jak i że interfaza skraca się o 1/3 (jeżeli przyjmie się, że kinetyna nie zmienia czasu trwania mitozy). Guttman w ostatecznej konkluzji uważa, że zachodzi zjawisko pośrednie, tzn. że kinetyna skraca okres interfazy, wydłużając czas trwania mitozy.

Wydało mi się celowe przeprowadzenie podobnych badań na materiale żywym, mierząc w każdym wypadku bezpośrednio czas trwania mitozy; przypuszczałam, że tą drogą uzyskam dokładniejsze dane.

Obserwacje mitozy w żywych komórkach dowodzą, że czas trwania wszystkich jej stadiów w warunkach obserwacji mikroskopowej u tych samych obiektów, umieszczonych w identycznym środowisku, waha się w dużych granicach; różnice mogą być dwu-, a nawet pięciokrotne. Zjawisko to zostało stwierdzone w endosper-

mie licznych gatunków roślin (Bajer 1953, 1954, Bajer i Molè-Bajer 1954), w liściu *Hymenophyllum* (Bajer i Molè-Bajer 1953). Zupełnie podobnie przedstawiają się różnice czasu trwania mitozy u klasycznego obiektu, który był również przedmiotem moich badań, a mianowicie we włoskach pręcikowych *Tradescantia virginiana* (Bělař 1930, Bajer 1950, Molè-Bajer 1951).

MATERIAŁ i METODY

Badania przeprowadzano w czerwcu i lipcu 1958 r., w temperaturze ok. 18°C. Przebieg mitozy śledzono w szczytowych komórkach włoska, wyjątkowo tylko w komórce drugiej od szczytu.

Z dotychczasowych badań nad kinetyną wiadomo (Guttman 1956, Olszewska 1959), że wzmacnia ona aktywność mitotyczną merystemu korzeniowego cebuli dopiero po 4—5 godzinach działania; przy dłuższym działaniu efekt ten zwiększa się. Z tego względu młode pączki kwiatowe *Tradescantia virginiana* wkładano do wody wodociągowej zawierającej kinetynę w koncentracji 10^{-6} ‰ na okres 18—20 godzin; pączki kontrolne (kontrola I) były w tym samym czasie w wodzie wodociągowej. Drugi rodzaj materiału kontrolnego (kontrola II) stanowiły pączki zerwane bezpośrednio przed obserwacją mikroskopową.

Do obserwacji mikroskopowej nitki pręcikowe pochodzące z obu grup pączków kontrolnych umieszczano w 1‰ wodnym roztworze sacharozy zgodnie ze wskazówkami Teleżyńskiego (1930—31), a nitki pręcikowe pochodzące z pączków poddanych działaniu kinetyny oglądano w 1‰ wodnym roztworze sacharozy zawierającym 10^{-6} ‰ kinetyny.

Według Teleżyńskiego (l.c.) olej parafinowy jest najodpowiedniejszym środowiskiem do przyżyciowych badań nad mitozą; jednym z momentów korzystnych jest wysoka rozpuszczalność w nim tlenu (Kobie, cyt. za Teleżyńskim). Wbrew dawniejszym poglądom, obecność tlenu jest zdaniem Bajera i Molè-Bajer (1954) u szeregu roślin koniecznym warunkiem do kontynuowania profazy. Ponieważ w moich eksperymentach nie można było stosować oleju parafinowego, roztwory, w których umieszczałam nitki pręcikowe, każdorazowo wzbogacałam w tlen posługując się pipetką.

Aby wyrównać warunki doświadczenia, przebieg mitozy w materiale kontrolnym i w materiale poddanym działaniu kinetyny śledziłam jednocześnie na dwóch lub trzech mikroskopach. Stosowałam mikroskopy typu Lumipan f-my Zeiss.

We wszystkich doświadczeniach około 15‰ jąder powracało z profazy do stadium spoczynkowego. Innego rodzaju zaburzeniem były zahamowane mitozy, w wyniku których powstawały jądra polyploidalne.

Rozgraniczenie poszczególnych stadiów mitozy przeprowadzano w oparciu o opisy i mikrofotografie Bělařa (1930).

Wyniki zestawione w tabeli 1 oparte są na obserwacji 27 mitoz dla kontroli I, 21 — dla kontroli II i 28 mitoz dla materiału poddanego działaniu kinetyny. W więk-

szości wypadków mitozy obserwowano począwszy od średniej profazy do rekonstrukcji jąder potomnych.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Przy porównywaniu uzyskanych rezultatów wypadło pominąć profazę i telofazę, tj. te stadia, których moment początkowy lub końcowy trudno jest dokładnie określić.

T a b e l a 1

Porównanie czasu trwania metakinezy, metafazy i anafazy wraz z początkiem telofazy w materiale kontrolnym i w materiale poddanym działaniu kinetyny

Comparaison de la durée de métakinèse (1), de métaphase (2) et d'anaphase avec le commencement de télophase (3).

Stadium Stade	Czas trwania Durée	Rodzaj doświadczenia — Traitement		
		kontrola I témoin I	kontrola II témoin II	kinetyna kinétine
Metakineza (1)	10—18'	7 47 ⁰ / ₀	3 50 ⁰ / ₀	1 8 ⁰ / ₀
	20—27'	8 53 ⁰ / ₀	1 17 ⁰ / ₀	9 69 ⁰ / ₀
	30—50'	— —	2 33 ⁰ / ₀	3 23 ⁰ / ₀
	7—20'	6 33 ⁰ / ₀	4 50 ⁰ / ₀	4 25 ⁰ / ₀
Metafaza (2)	21—36'	9 50 ⁰ / ₀	3 38 ⁰ / ₀	6 37 ⁰ / ₀
	40—70'	3 16 ⁰ / ₀	1 12 ⁰ / ₀	6 37 ⁰ / ₀
Anafaza i wczesna telo- faza do zapo- czątkowania przegrody pier. (3)	10—18'	6 31 ⁰ / ₀	4 27 ⁰ / ₀	5 38 ⁰ / ₀
	20—30'	8 42 ⁰ / ₀	10 67 ⁰ / ₀	5 38 ⁰ / ₀
	30—42'	5 26 ⁰ / ₀	1 6 ⁰ / ₀	3 23 ⁰ / ₀

Czas trwania metakinezy, metafazy oraz anafazy wraz z wczesną telofazą (do momentu pojawienia się zaczątków przegrody pierwotnej) wahał się w szerokich granicach; jest to zjawisko stale spotykane w warunkach obserwacji mikroskopowej, o czym wspomniano we wstępie. Z tego względu było bezcelowe ustalanie średnich dla czasu trwania tych stadiów. Wydaje się jednak, że trwanie metakinezy i metafazy ulega pod wpływem kinetyny — w porównaniu z obydwojma rodzajami kontroli — pewnemu wydłużeniu. Wyodrębnienie bowiem pewnych klas (tabela 1) pozwala na stwierdzenie, że w wypadku metakinezy i metafazy w materiale poddanym działaniu kinetyny wyraźnie maleje liczebność klas obejmujących najkrótsze czasy, natomiast wzrasta liczebność klasy zawierającej najdłuższe czasy trwania tych stadiów.

Co się tyczy anafazy wraz z początkiem telofazy (do momentu zapoczątkowania przegrody pierwotnej), to w komórkach, które pozostawały pod wpływem kinetyny, słabo zaznacza się zjawisko odwrotne: przesunięcie liczebności klas w kierunku krótszych czasów.

Małe stosunkowo wahania wykazuje czas tworzenia się przegrody pierwotnej (dla kontroli I — od 4 do 7 min, dla kontroli II — od 4 do 6 min, dla materiału poddanego działaniu kinetyny — od 3 do 4 min), co pozwala na porównanie wartości średnich arytmetycznych. Powstawanie przegrody pierwotnej w komórkach kontrolnych trwa średnio 4,8 min (kontrola I) i 4,6 min (kontrola II), (po 15 komórek obserwowanych), a w komórkach dzielących się w obecności kinetyny — 3,5 min (11 komórek obserwowanych). Pod wpływem kinetyny zachodzi więc skrócenie czasu, podczas którego zakłada się przegroda pierwotna. Zjawisko to może się wiązać z szybszym powstawaniem fragmoplastu, co byłoby przyczyną nieznacznego skracania się czasu trwania anafazy wraz z początkami telofazy (tab. 1).

Rola kinetyny w cytokinezie była już podkreślona przez Dasa, Patau i Skooga (1956), którzy stwierdzili, że w rdzeniu tytoniu hodowanym *in vitro* dodanie IAA powoduje zwiększenie ilości kariokinez, przy czym wskutek braku cytokinezy powstają liczne komórki dwujądrowe, natomiast w obecności kinetyny i IAA powstają obficie komórki jednojądrowe. Autorzy ci przypuszczają, że kinetyna może stanowić czynnik stymulujący szczególnie cytokinezę — w odróżnieniu od IAA, który byłby czynnikiem stymulującym wyłącznie kariokinezę. W badaniach naszych (których wyniki zostaną opublikowane osobno) całkowicie potwierdza się wpływ kinetyny na szybsze zakładanie przegrody pierwotnej; szereg danych wskazuje na antagonistyczne zachowanie się kinetyny w stosunku do specyficznych inhibitorów cytokinezy.

Obserwacje wskazujące na przedłużenie czasu mitozy, które zachodzi pod wpływem kinetyny, mogłyby podważyć wnioski o zwiększeniu aktywności mitotycznej spowodowanej jej działaniem (Guttman 1956, Olszewska 1959), ponieważ zwiększenie ilości komórek dzielących się w stosunku do ilości komórek nie dzielących się mogłoby być spowodowane przez wydłużenie czasu mitozy. Udało się nam jednak dostatecznie udowodnić, że w innych wypadkach (nitki *Spirogyra*, kalus, felogen) następowało zwiększenie ilości nowo powstałych komórek (Olszewska, Maciejewska-Potapczykowa, Sempłńska 1957, Olszewska 1958). Podobnie zresztą przybywanie dużej ilości komórek zostało wykazane u *Euglena* przez Supniewskiego i współprac. (1957) oraz przez Guttman i Backa (1958) w doświadczeniach nad *Paramecium*.

Dane dotąd uzyskane wskazują, że działanie kinetyny polega na skróceniu interfazy, połączonym prawdopodobnie z przyspieszeniem przemian bezpośrednio związanych z wejściem komórki w profazę.

Skrócenie interfazy, zachodzące pod wpływem kinetyny, byłoby związane przede wszystkim ze wzmożeniem syntezy kwasu rybonukleinowego i, co za tym idzie,

białek, co udowodniłam metodą autoradiograficzną badając merystem korzeniowy *Allium cepa* (Olszewska 1959 a i b). Pobudzanie przez kinetynę syntezy DNA (jednego z procesów preprofazowych) zostało wykazane przez Patau, Dasa i Skooga (1957). Za stymulowaniem przemian preprofazowych przemawia — poza zwiększeniem aktywności mitotycznej w tkankach merystematycznych — szybsze tworzenie kalusa w obrębie tkanek zróżnicowanych (Olszewska, Maciejewska-Potapczykowa, Sempłowska 1957).

STRESZCZENIE

Zbadano we włoskach pręcikowych *Tradescantia virginiana* czas trwania meta-kinazy, metafazy, anafazy łącznie z okresem wczesnej telofazy (do momentu zapoczątkowania przegrody pierwotnej) oraz czas tworzenia się przegrody pierwotnej. Pod wpływem kinetyny (conc. 10^{-6} %) metakineza i metafaza przebiega dłużej, nieznacznie skraca się okres obejmujący anafazę i wczesną telofazę, natomiast tworzenie przegrody pierwotnej trwa wyraźnie krócej.

Katedra Anatomii i Cytologii Roślin
Uniwersytetu Łódzkiego

(Wpłynęło dn. 10.2.1959 r.)

RÉSUMÉ

On a étudié, dans les poils staminaux de *Tradescantia virginiana*, la durée 1) de la métakinèse, 2) de la métaphase, 3) de l'anaphase avec le commencement de la télophase, jusqu'à l'initiation de la plaque cellulaire, 4) de la formation de plaque cellulaire. Sous l'influence de la kinétine (conc. 10^{-6} %), la métakinèse et la métaphase s'effectuent plus lentement, l'anaphase examinée au total avec le début de telophase est de durée relativement plus courte, tandis que la formation de la plaque cellulaire se passe beaucoup plus rapidement.

LITERATURA

- Bajer A., 1950, Acta Soc. Bot. Pol., 20: 709—737.
Bajer A., 1953, Acta Soc. Bot. Pol., 22: 475—482.
Bajer A., 1954, Acta Soc. Bot. Pol., 23: 383—412.
Bajer A., Molè-Bajer J., 1953, Acta Soc. Bot. Pol., 22: 267—288.
Bajer A., Molè-Bajer J., 1954, Acta Soc. Bot. Pol., 23: 69—110.
Bělař K., 1930, Zeitschr. Zellforsch., 10: 73—134.
Das N. K., Patau K., Skoog F., 1956, Physiol. Plant., 9: 640—651.
Guttman R., 1956, Chromosoma, 8: 341—350.
Guttman R., Back A., 1958, Nature, 181: 852.
Marczyński T., 1958, Bull. Ac. Pol. Sc., ser. biol., 6: 119—124.
Miller O., Skoog F., Okumura F., Saltz M., Strong F., 1955, J. Amer. Chem. Soc., 77: 2662.

- Miller O., Skoog F., Saltz M., Strong F., 1955, J. Amer. Chem. Soc., 77: 1392.
- Molè-Bajer J., 1951, Acta Soc. Bot. Pol., 21: 73—94.
- Ogawa V., Abe Y., Fujioka K., 1957, Nature, 180: 985.
- Olszewska M.J., 1958, Bull. Sos. Sc. Let. de Łódź, Cl. III. N°1.
- Olszewska M.J., 1959 a. Expl. Cell Res., 16: 193-201.
- Olszewska M.J., 1959 b, Acta Soc. Bot. Pol., 28: 175—183.
- Olszewska M.J., Maciejewska Potapczykowa W., Sempłńska E., 1957, Acta Soc. Bot. Pol., 26: 583—596.
- Patau K., Das N.K., Skoog F., 1957, Physiol. Plant., 10: 949—966.
- Supniewski J., Krupińska J., Supniewska H., Wacław B., 1957 Bull. Ac. Pol. Sc., sec. biol., 5: 19—28.
- Teleżyński H., 1930/31, Acta Soc. Bot. Pol., 7: 381—434.