Zawartość kwasu desoksyrybonukleinowego oznaczonego mikrofotometrycznie w jądrach pyłku *Tradescantia bracteata*

*Measurements of desoxyribose nucleic acid by Feulgen-photometry
in nuclei of pollen grains of Tradescantia bracteata*

B. RODKIEWICZ

Uderzającym zjawiskiem w rozwoju pyłku jest utworzenie i zróżnicowanie się jąder generatywnego i wegetatywnego. Pierwszy podział odbywa się w części przysciennej komórki i przeważnie charakteryzuje się asymetrycznym wrzecionem. W rezultacie podziału jedno jądro układa się w pobliżu ściany pyłku, a drugie ku środkowi komórki. Pomimo wcześnie występujących różnic morfologicznych jądra te początkowo wydają się być równocenne, a ich późniejsze przemiany są, według opinii większości autorów, determinowane przez cytoplazmę pyłku, wykazującą zdecydowaną biegunowość (według V a z a r t 1958). Cytoplazma komórki generatywnej jest stosunkowo homogenna, uboższa w białka i kwas rybonukleinowy od cytoplazmy komórki wegetatywnej. Równocенność jąder udało się zademonstrować doświadczalnie przez zastosowanie szoków temperatury (L a C o u r 1949), krótkich promieni (K o e l l e r 1943), a także w naturalnie występujących odmianach genetycznych (L a C o u r 1949). W wymienionych przypadkach biegunowość komórki została zniewelowana w sposób sztuczny lub dzięki pojawieniu się nowych czynników genetycznych i oba jądra rozwijały się według podobnego wzoru.

W normalnym rozwoju jądro generatywne wzbogaca się w KDN, zmienia kształt z kulistego w wydłużony, przesuwając się jednocześnie ku środkowi pyłku. Jądro wegetatywne zwiększa objętość i traci stopniowo zasadochłonność (L i n d e m a n n 1956, W o o d a r d 1958, P o l j a k o v a 1958 i inni). Często opisywano wypadki obniżania się intensywności, a nawet całkowitego zniknięcia reakcji Feulgena już we wczesnych fazach rozwoju jąder wegetatywnych. Natomiast cytoplazma komórki wegetatywnej znacznie zwiększa zawartość białek i kwasu rybonukleinowego (P a i n t e r 1943, L a C o u r 1949, W o o d a r d 1958). W końcu jądro wegetatywne ulega całkowitej degeneracji.

Pomiary fotometryczne KDN w jądrach wegetatywnych dawały sprzeczne rezultaty. Część autorów stwierdzała w nich wyższy poziom KDN, niż powinien występować w haploidalnym jądrze, inni znajdowali haploidalną ilość KDN — 1c (Literatura zreferowana przy omawianiu wyników). Z badań tych jednak widać, że w początkowych fazach rozwoju pyłku jądro wegetatywne nie ubożeje w KDN, jak przypuszczano opierając się na ocenie mikroskopowej bez pomiarów obiektywnych. Wrażenie szybkiego zanikania reakcji Feulgena da się wyjaśnić rozrzedzaniem się barwnika w powiększającym się jądrze wegetatywnym i kontrastem pomiędzy jego słabym zabarwieniem a intensywnym zabarwieniem jądra generatywnego.

MATERIAŁ I METODY

Pylniki i wierzchołki wzrostu korzeni *Tradescantia bracteata* hodowanej w doniczkach w szklarni utrwalano w płynie Carnoy (alkohol i kwas octowy 3:1). Materiał zbierano wczesną wiosną w marcu i jesienią we wrześniu. Następnie in toto w ściśle określonych warunkach przeprowadzano reakcję Feulgena (6 min. hydroliza w 1n HCl w t 60°C, 1½ godz. w odczynniku Schiffa, 30-minutowe płukanie w 3 zmianach płynu do płukania). Z zabarwionego materiału sporządzano gniecione preparaty w kropli gliceryny na szkiełku przykrywkowym. Względna zawartość KDN mierzono w densitometrze Deelego (Deeley 1955). Pomiary wykonywano jedynie na rozgniecionych jądrach o dość regularnym kolistym kształcie. Z tego powodu nie można było mierzyć jąder generatywnych w późniejszych fazach rozwoju. Dalszą trudność sprawiało dostatecznie dobre rozgniecenie obu jąder w jednym pyłku. W większości wypadków tylko jedno jądro nadawało się do pomiaru, toteż jedynie w nielicznych pyłkach udało się zmierzyć zawartość KDN w obu jądrach.

OBSERWACJE WŁASNE

Przeprowadzono dwie serie pomiarów fotometrycznych, jedną na materiale szklarniowym utrwalonym wiosną, a drugą również na materiale szklarniowym, ale utrwalonym jesienią. Obrazy morfologiczne rozwoju pyłku w obu materiałach były w zasadzie podobne i zgodne z opisami rozwoju pyłku u *Tradescantia bracteata* (La Cour 1949) i u *T. virginiana* (Gimesi i Maroti 1951).

Zawartość KDN w jądrach pyłków zebranych wiosną i jesienią kształtuje się w sposób nieco różny. Mikrospory z materiału wiosennego z utworzonymi grubymi ścianami (Tabl. Ia), posiadają jądra, które przy porównaniu z diploidalnymi komórkami wierzchołka wzrostu korzenia (histogram a), zawierają KDN w ilości odpowiadającej haploidalnej liczbie chro-

mosomów (histogr. b). Wielkość odczytów jest dość stała, jak wykazuje histogram, i nie zależy od zagęszczenia substancji jądrowej zmieniającego się wyraźnie w mikrosporangach. Po podziale jądra mikrospory w obu jądrach potomnych znajdują się dokładnie (jak na pomiary fotometryczne) jednakowe ilości KDN (Tabela 1). W miarę różnicowania się w obu jądrach zwiększa się zawartość KDN (histogram c). W tym czasie albo oba jądra

Histogram 1. Zawartość KDN w jądrach trzykrotki po reakcji Feulgena. a — klasa 2c w merystemie korzenia; b — młode mikrospory, 1c; c — różnicujące się jądra wegetatywne i generatywne (zakreskowane) z pyłku zebranego wiosną; d — różnicujące się jądra wegetatywne i generatywne (zakreskowane) z pyłku zebranego jesienią. Profazy (P) i metafazy (M) pierwszego podziału w pyłku zebranym wiosną i jesienią.

DNA content in *Tradescantia* pollen after Feulgen reaction. a — 2c class in root meristem; b — young microspores 1c; c — differentiating vegetative and generative (shaded) nuclei in spring pollen; d — differentiating vegetative and generative (shaded) nuclei in autumn pollen. Prophases (P) and metaphases (M) of first division in pollen gathered in spring and autumn

pozostają jeszcze kuliste (Tabl. 1e), albo generatywne ulega nieznacznemu wydłużeniu. Synteza KDN w jądrze wegetatywnym odbywa się wolniej niż w generatywnym, nie osiągając wartości 2c odpowiadającej diploidalnemu jądru. Nierównomierną szybkość syntezy demonstruje nie tylko histo-

Tabela 1

Zawartość KDN w jądrze wegetatywnym i generatywnym
pyłku trzykrotki. Pary jąder z jednego pyłku
KDN w jednostkach względnych
DNA in arbitrary units

Jądra wegetatywne Vegetative nuclei	Jądra generatywne Generative nuclei
165	169
150	146
147	152
140	150

gram c, ale jeszcze wyraźniej pomiary jąder znajdujących się w jednym pyłku (Tabela 2). Zawartość KDN w jądrach wegetatywnych jest nieco niższa w porównaniu z odpowiednimi im generatywnymi. Synteza KDN w jądrze generatywnym odbywa się jeszcze, zanim zmieniło ono

Tabela 2

Zawartość KDN w różnicujących się jądrach wegetatywnym
i generatywnym znajdujących się w jednym pyłku trzykrotki
Pyłek zbierany wiosną
KDN w jednostkach względnych
DNA in arbitrary units

Jądra wegetatywne Vegetative nuclei	Jądra generatywne Generative nuclei
220	320
217	290
210	273
203	305
195	290

kształt, tak że pomiar jest niemożliwy. W rezultacie syntezy jądra osiąga wartość 2c, natomiast w jądrze wegetatywnym nie zanotowano większej ilości KDN niż 1,3—1,4 c, nawet jeśli mierzono je w starszym nieco pyłku, gdzie jądra generatywne są wydłużone (Tabl. 1f). Jednak, jak widać, obserwuje się w jądrach wegetatywnych wyraźne podniesienie się ilości KDN w porównaniu z wartością haploidalną — 1c.

W materiale zebranym jesienią ani w jądrach wegetatywnych, ani w generatywnych w ciągu okresu różnicowania się, aż do utworzenia wydłużonego jądra generatywnego, nie zauważno istotnego wzrostu ilości KDN powyżej poziomu 1c (Histogram d). Być może w jądrze generatywnym synteza następuje już po zmianie kształtu, ale to nie było możliwe do sprawdzenia przy zastosowanej metodzie.

Metafazy i profazy (Tabl. I b, c) pierwszego podziału zarówno w materiale wiosennym, jak i jesiennym zawierają takie same ilości KDN, odpowiadają one wartości 2c. W anafazie (Tabl. Id) każda grupa chromosomów posiada 1c.

DYSKUSJA

Przedstawione dane pozwalają, jak się zdaje, na wytłumaczenie sprzecznych wyników otrzymywanych w pracach przy pomiarach mikrospektrofotometrycznych KDN w jądrach wegetatywnych niektórych gatunków trzykrotki i innych roślin.

Należy oczywiście pamiętać o niebezpieczeństwie interferencji białek, lub innych związków, z wynikami fotometrii po reakcji Feulgena. Taka możliwość poważnego zniekształcenia pomiarów zwiększa się szczególnie w wypadku porównywania obiektów, o których wiadomo lub przypuszcza się, że ich skład chemiczny różni się bardzo znacznie od siebie. Wydaje się, że powyższe zastrzeżenie w omawianej pracy nie jest specjalnie ważne. Porównuje się bowiem ze sobą nie tylko jądra generatywne i somatyczne, ale i wartości KDN jąder wewnątrz tych kategorii. W wielu momentach otrzymywano wyniki zgodne z założeniami teoretycznymi, na przykład zawartość KDN po mejozie wynosi 1c, w profazie podziału w mikrosporze 2c, również 2c komórek generatywnych jest takie same jak 2c komórek tkanki zróżnicowanej.

Pasteels i Lison (1951) nie stwierdzili zwiększania się ilości KDN w jądrach wegetatywnych *Tradescantia virginiana*, *Lilium croceum* i *Scilla nutans*. Opisują oni również równomierny rozdział KDN pomiędzy jądro wegetatywne i generatywne i wzrost ilości KDN w tym ostatnim do 2c. U *Tradescantia palludosa* jądro generatywne przekształca się z 1c na 2c (Swift 1950). Podobnie Woodard (1958) u tej samej rośliny obserwował wzrost w jądrze generatywnym z 1c do 2c przy jednoczesnym braku syntezy w jądrze wegetatywnym. Natomiast Bryan (1951) znalazł bardzo wysoką zawartość KDN w obu jądrach pyłku u tejże *T. palludosa*. Jądro wegetatywne według niego osiąga 3c, ale w telofazie pyłku; zupełnie odmiennie niż inni autorzy stwierdził on 2c KDN w każdym jądrze potomnym. Moses i Taylor (1955) wzmiankują wzrost ilości KDN w jądrach wegetatywnych trzykrotki do 1,4c. Oznaczanie chemiczne

fosforu KDN w mikrosporach i dojrzałym pyłku *Lilium longiflorum* (Ogur i in. 1951) wskazują na duży wzrost ilości KDN. Komórki pyłku zawierały 7 razy więcej P z KDN niż haploidalne mikrospory.

Synteza KDN w jądrze wegetatywnym i początkowym okresie rozwoju jądra generatywnego u *Tradescantia bracteata* może być uzależniona od warunków zewnętrznych. W omawianym wypadku różnica w syntezie związana była prawdopodobnie z porą roku, w której dojrzewały rośliny, chociaż rosły one przez cały czas w szklarni.

Niejasne natomiast pozostaje znaczenie wzrostu ilości KDN w jądrze wegetatywnym, które z reguły nie ulega podziałowi (ale w rzadkich wypadkach może się dzielić) i często dość szybko degeneruje. Synteza KDN może się tu wiązać z intensywną syntezą białek i kwasu rybonukleowego w cytoplazmie komórki wegetatywnej. Związek, a nawet zależność tych procesów sugerowano niejednokrotnie. Zwiększenie się ilości KDN w jądrze wegetatywnym odbywa się być może na drodze endopoliploidyzacji, jakkolwiek takiego procesu do końca nie udało się prześledzić, zawartość bowiem KDN nie przekraczała liczby 1,3—1,4c.

STRESZCZENIE

Oznaczano fotometrycznie zawartość KDN w jądrach pyłku *Tradescantia bracteata*. W profazie i metafazie I podziału ilość KDN wynosi 2c, czyli odpowiada diploidalnej liczbie chromosomów. Jądra wegetatywne i generatywne otrzymują równe ilości KDN. W materiale zbieranym wiosną w obu jądrach odbywa się synteza KDN. Jądro generatywne osiąga poziom 2c, wegetatywne 1,3—1,4c. W materiale jesiennym nie zauważono syntezy ani w jądrach wegetatywnych, ani w początkowych fazach rozwoju jądra generatywnego.

Praca została wykonana w John Innes Horticultural Institution. Za udostępnienie aparatury autor dziękuje dyrekcji Instytutu, a za stypendium Min. Szkolnictwa Wyższego.

Katedra Anatomii i Cytologii Roślin UL
Łódź

(Wpłynęło: dn. 19.11.1959 r.)

SUMMARY

DNA content in successive stages of single nuclei in pollen of *Tradescantia bracteata* was measured by Feulgen photometry (Plate I a-f). The plants were cultivated in greenhouse and the anthers were fixed in March and September with alcohol and acetic acid (3:1). DNA was equally distributed between vegetative and generative nuclei (table I). In nuclei from spring material the synthesis of DNA takes place. In generative nucleus the rate of synthesis is faster (table 2); these nuclei reach the value of 2c, while vegetative nuclei — only 1.3—1.4c (histogr. c). In autumn material the increase of DNA-content was not observed in vegetative nuclei nor in generative ones before their elongation (histogr. d). When evaluating the results obtained the possible influence of different nuclear substances on the photometric measurements of DNA must be considered. Specially dangerous are the comparisons of nuclei from different types of cells.

Author's sincere thanks are due to the John Innes Horticultural Institution for the disposal of all working facilities and apparatus as well as to the Ministry of Higher Education for scholarship.

Department of Plant Anatomy and Cytology
University of Lodz, Lodz, Poland

LITERATURA

- Bryan J. H., 1951, *Chromosoma* 4: 369—392.
Deeley E. M., 1955, *J. Sci. Instr.* 32: 263.
LaCour L. F., 1949, *Heredity* 3: 319—338.
Gimesi N., Maroti M., 1951, *Ann. Biol. Univ. Budapest* 1: 69—75.
Lindemann R., 1956, *Planta* 48: 2—23.
Moses M. J., Taylor J. H., 1955, *Expl. Cell Res.* 9: 474—488.
Ogur M., Erikson R. O., Rosen G. U., Sax K. B., Holden C., 1951, *Expl. Cell Res.* 2: 73—89.
Painter T. S., 1943, *Bot. Gazet.* 105: 58—68.
Pasteels J., Lison L., 1951, *Compt. rend. Ac. Sc. Paris* 233: 196.
Poljakova T. F., 1958, *Vestn. Leningr. Univ.* 3: 63—76.
Swift H., 1950, *Proc. Ntl. Ac. Sc. US.* 36: 643—654.
Vazart B., 1958, *Protoplasmatologia VII* (3a) Wien Springer pp. 158.
Woodard J. W., 1958, *J. Bioph. Biochem. Cytol.* 4: 383—389.

TABLICA I — PLATE I

Rozwój pyłku trzykrotki

a — mikrospora; b — profaza I podziału w pyłku; c — metafaza I podziału; d — anafaza I podziału; e — jądro wegetatywne i generatywne niedługo po zakończeniu podziału; f — zróżnicowane jądra wegetatywne i generatywne (Preparaty barwione Feulgenem. Zdjęcia wykonane spod tego samego powiększenia)

The development of *Tradescantia* pollen

a — microspore; b — prophase I of pollen mitosis; c — metaphase; d — anaphase I; e — vegetative and generative nuclei soon after the completion of mitosis; f — differentiated vegetative and generative nuclei. (Feulgen stained preparations. Photos of the same magnification)