

JANINA DĄBROWSKA

OBSERWACJA MITOZY

*Z Zakładu Botaniki Ogólnej
Uniwersytetu Wrocławskiego*

ABSTRACT. Author proposes short squash method with orcein and *Allium* sp., practical in didactics especially and gives some remarks as for karyological observations.

Key words: squash method, mitosis, *Allium* sp.

Wstęp

Metoda preparatów gniecionych (*squash method*) według niżej opisanego schematu wymaga ok. 40 minut. Można ją stosować, z pewnymi modyfikacjami lub bez nich, do obserwacji różnych roślin.

Metoda jest przydatna zarówno w pracy badawczej, jak i dydaktycznej.

Materiały i metody

Material

Do celów dydaktycznych oplaca się używać czosnku (*Allium* sp.), gdyż z jednej główki można po kilku dniach uzyskać nawet ponad 200 korzeni 1-3-centymetrowej długości, odpowiednich do obserwacji mitozy. Cebula bywa przez handlowców traktowana substancjami hamującymi wytwarzanie korzeni podczas przechowywania, toteż zdarza się, że zawodzi jako obiekt do takich obserwacji.

Główkę czosnku należy umieścić na naczyniu z wodą tak, aby między powierzchnią wody a główką było nieco przestrzeni. Dobrze jest zmieniać wodę codziennie. Inne

materiały to: minutnik, naczynko z wodą (mały krystalizator lub większe zegarkowe), ustawione na małym kwadracie czarnej folii (wtedy lepiej widać wierzchołki wzrostu korzeni, mlecznobiałe, z powodu gęściejszej cytoplazmy komórek merystemu), dwie małe fiołki po tabletkach, z plastikowymi, szczelnymi korkami (na płyn maceracyjny i 45-procentowy kwas octowy), mała pinceta, lignina, szkiełka przedmiotowe i nakrywkowe (zamiast szkiełek nakrywkowych można z powodzeniem użyć celofanu, według propozycji **Murina** (1960), wcześniej przygotowany 2-procentowy roztwór orceiny (rozpuszcza się ją na gorąco w 45-procentowym kwasie octowym i filtruje) oraz zakraplacz szklany do orceiny. Płyn maceracyjny: 1 część HCl stęż. + 3 części etanolu 96-procentowego (bywają też stosowane inne proporcje: 1:1, 1:2 – zależnie od badanego materiału).

Warto zaznaczyć, że jak pisze **Ellerström** (brak daty), za najlepszą uważa się orceinę firmy GURR (Anglia), co również zostało potwierdzone przez autorkę.

Metoda

- Korzenie czosnku odcina się, najlepiej w godzinach porannych, i umieszcza w naczynku z wodą.
 - Po osączeniu z wody korzenie poddaje się maceracji przez 6 minut (czas odpowiedni dla czosnku, lecz nie dla bardzo cienkich lub nawet grubszych korzeni).
 - Zmacerowane korzenie przenosi się bardzo ostrożnie do wody, uprzednio osączając je z płynu macerującego, po czym płucze przez 10 minut.
 - Osączone z wody korzenie przenosi się do 45-procentowego kwasu octowego na minimum 10 minut. W tymże kwasie korzenie mogą się znajdować dłużej, nawet kilkadziesiąt minut, jeśli obserwacje przedłużają się.
 - Na szkiełko przedmiotowe nanosi się kroplę orceiny (nie należy poruszać naczyniem z orceiną, aby nie pobrać osadów – orceina nie rozpuszcza się zbyt dobrze).
 - Po osączeniu z kwasu korzeń umieszcza się na szkiełku przedmiotowym blisko kropli barwnika, odcina się mniej niż 1 mm wierzchołka (warunek udanego preparatu – **Ellerström**) i przesuwa do kropli orceiny. Czynność należy wykonać zgrabnie i szybko, aby korzeń nie wysechł.
 - Po chwili nakłada się szkiełko nakrywkowe i przytrzymując jeden jego narożnik, lekko ostukuje się preparat dookoła, uważając, aby nie przesunąć szkiełka.
 - Na szkiełku nakrywkowym umieszcza się mały kwadrat ligniny i mocno, lecz ostrożnie naciska się go kciukiem.
- Obserwacje wykonuje się za pomocą filtru zielonego (koniecznego w mikrofotografii), w powiększeniu 12,5 × 40 lub 100 × (imersja). Odcięcie zbyt dużego skrawka korzenia uniemożliwia uzyskanie jednej warstwy komórek. Jeśli obserwacja ma trwać dłuższy czas, szkiełko nakrywkowe można uszczelnić wazeliną.

Zamiana preparatów gniecionych na trwale

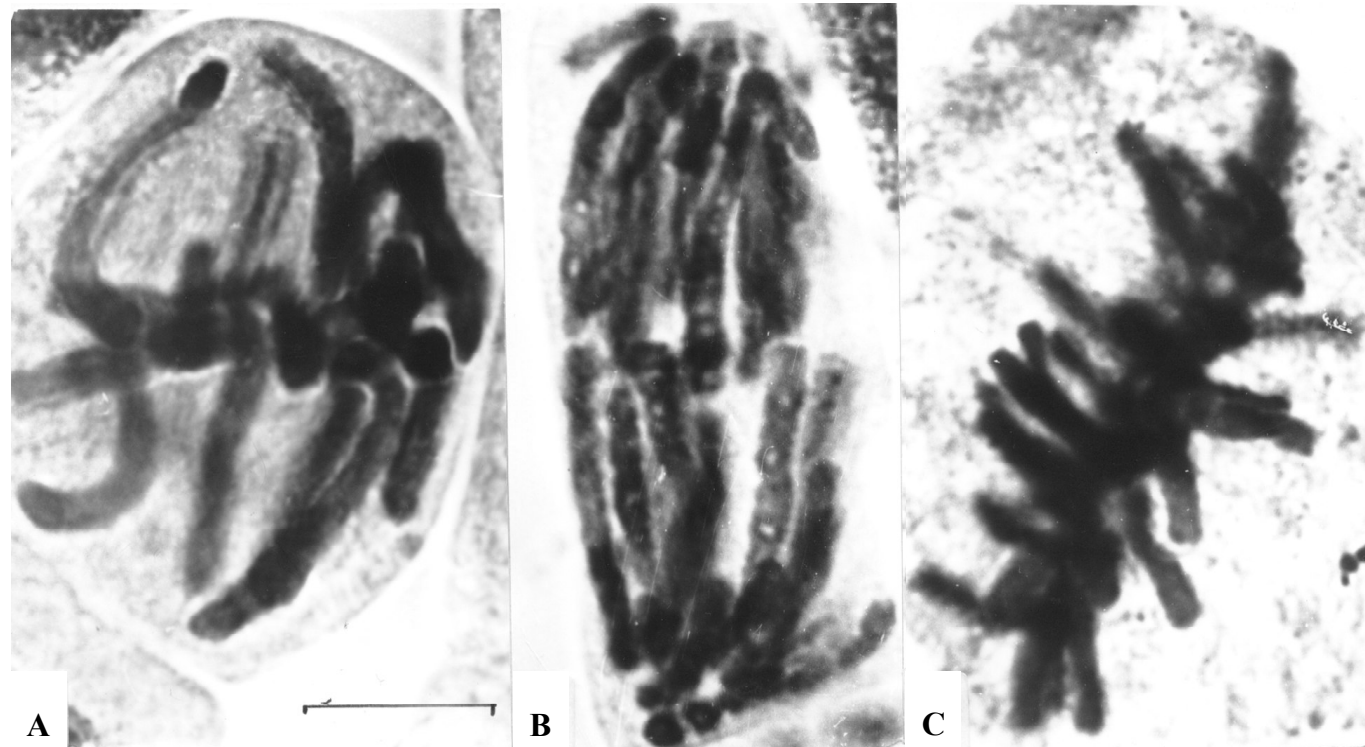
Preparat gnieciony umieszcza się w zamrażalniku lodówki (na szkiełku nakrywkowym może pozostać olejek imersyjny). Po kilku dniach (zwykle po tygodniu, jeśli są to

zajęcia dydaktyczne) preparaty wyjmuje się z zamrażalnika i szybko rozdziela się szkiełka, układając je preparatem do góry. Oba preparaty odwadnia się kolejno w szeregu: etanol w stężeniu 50%, 70%, 96%, 100% i izopropanol. Na przepłukany w ten sposób preparat nakłada się kroplę euparalu i nakrywa szkiełkiem nowym lub poprzednim, z częścią preparatu na nim, tak aby nie przykrywały się. Po rozmrożeniu fragmenty preparatu zostają czasem na obu szkiełkach lub tylko na jednym. Nie zawsze więc udaje się uratować cały preparat. Tak wykonane preparaty suszy się przez jakiś czas. Euparal jest korzystniejszy niż balsam kanadyjski, ponieważ po odwadnianiu w alkoholach nie wymaga płukania w ksylenie, który nie jest obojętny dla zdrowia.

Uwagi do metody

Na zajęciach dydaktycznych, dla porównania z czosnkiem, można także zademonstrować chromosomy bardzo małe, np. u kapusty pekińskiej, oraz prawdopodobnie największe w świecie roślin, u *Haemanthus* sp. (ozdobna roślina doniczkowa z *Amaryllidaceae*) (fot. 1). Kapusta pekińska kiełkuje na szalce po 1-2 dniach, a chromosomy w metafazie to małe punkciki, trudne do zmierzenia. W przypadku *Haemanthus* sp. wiosną, po wydobyciu rośliny z doniczki, pobiera się białe wierzchołki korzeni i utrwała się je w sporządzonym tuż przed użyciem utrwalczu (acetoalkohol: 1 część kwasu octowego lodowatego i 3 części etanolu 96-procentowego). Jeśli zamierzamy analizować je od razu, wówczas bardzo gruby korzeń dzieli się na cztery części wzdłuż i maceruje w płynie w sposób opisany wyżej, lecz przez 10 minut lub nieco krócej. W pracach badawczych posługujemy się zwykle siewkami wyrosłymi na szalce Petriego, wówczas całe siewki z liścieniami traktuje się w podany wyżej sposób. Niezwykle cienkie korzenie maceruje się kilka sekund. Czasem korzysta się z korzeni roślin dorosłych. Można wówczas świeżo wykopany roślinom przyciąć korzenie, aby pobudzić je do wytwarzania korzeni bocznych. Gdy rośliny umieszczone w wodzie, w temperaturze pokojowej wytworzą korzenie boczne, a pora roku nie jest korzystna dla podziałów, można zastosować metodę szoku termicznego, umieszczając korzenie na przemian w wodzie zimnej i bardzo ciepłej. Autorka wypróbowała ten sposób na roślinach krwawnika wykopanych w grudniu spod śniegu. Nie ma metody uniwersalnej, toteż potrzeba nieraz wiele czasu, aby sprawdzić wszystkie parametry rośliny dotąd nie badanej. Jest wiele modyfikacji metody preparatów gniecionych, w tym np. dłuższe przetrzymywanie korzeni w orceinie.

Jeśli celem obserwacji jest policzenie chromosomów metafazowych, to przed wyżej opisaną procedurą traktuje się korzenie, przeważnie przez cztery godziny, inhibitorem wrzeczona kariokinetycznego (lub mieszaniną inhibitorów). Następnie można materiał utrwalić w acetoalkoholu (przygotowanym tuż przed użyciem) i barwić w terminie późniejszym lub kontynuować analizę (płukanie, maceracja itd.). Z doświadczeń autorki wynika, że o wiele lepsze rezultaty można osiągnąć, barwiąc korzenie nieutrwalane.



Fot. 1. Preparaty gniecione barwione orceiną (powiększenie $K4 \times 100$ (imersja), filtr zielony, mikroskop Zeissa typ Nf): A-B – metafaza i anafaza w wierzchołku wzrostu korzenia *Haemanthus* sp. (*Amaryllidaceae*), C – metafaza w wierzchołku wzrostu korzenia zielistki (*Chlorophytum* sp.) z rodziny *Liliaceae*; skala $10 \mu\text{m}$ (fot. J. Dąbrowska)

Phot. 1. Squash method, staining with orcein. Photographs were taken with Zeiss microscope, Nf type (magnification $K4 \times 100$, immersion, green filter): A-B – metaphase and anaphase in root-tips of *Haemanthus* sp. (*Amaryllidaceae*), C – metaphase in root-tips of *Chlorophytum* sp. (*Liliaceae*); scale bar $10 \mu\text{m}$ (photo by J. Dąbrowska)

Dyskusja

Nie ulega wątpliwości, że obserwacje kariologiczne mogą wiele wnieść do prac różnego typu, np. fizjologicznych, ekologicznych, fitogeograficznych etc., a w pracach taksonomicznych są raczej niezbędne. Zdarza się, że jeden takson może występować w dwu różnych cytotypach, np. jako di- i tetraploidy. U *Achillea crithmifolia* W. et K. w Polsce autorka znalazła formy tetraploidalne ($2n = 36$), lecz nigdy nie natrafiła na diploidalne (Dąbrowska 1971), a u diploidalnego *Achillea lingulata* W. et K. znalazła formy tetraploidalne (Dąbrowska 1989). Obecnie znanych jest już 10 taksonów *Achillea*, które występują w dwu formach, di- i tetraploidalnej (Dąbrowska 1992). W literaturze można znaleźć informacje o wielu takich przypadkach u innych roślin. Gdy więc obserwuje się różnorodność populacji jakiegoś taksonu i wnioskuje się o wpływie siedliska, to nie jest sprawą błahą, aby poznać te populacje także od strony cytologicznej. Poliploidy mają większe komórki, a w większych komórkach procesy przebiegają wolniej niż w małych komórkach. Poliploidy kwitną później niż diploidy, mają także więcej chloroplastów w komórkach szparkowych niż diploidy (Dąbrowska 1971). Obserwacje kariologiczne mogą więc być cennym uzupełnieniem różnych danych zebranych przez ekologa, umożliwić lepsze poznanie natury populacji, a niekiedy wiele wyjaśnić.

Wnioski

1. Czosnek (*Allium* L.) jest bardzo dogodnym obiektem do obserwacji mitozy (duże chromosomy, wytwarzanie bardzo wielu korzeni przybyszowych już kilka dni po umieszczeniu nad wodą).
2. Metoda preparatów gniecionych w dość skróconej wersji może być polecana jako bardzo praktyczna, szczególnie do celów dydaktycznych.
3. Obserwacje kariologiczne warto szerzej uwzględniać w pracach różnego typu, np. ekologicznych. Charakterystyka populacji opisywanej przez ekologa będzie pełniejsza, jeśli będzie zawierać dane cytologiczne.

Literatura

- Dąbrowska J. (1971): Korelacja między liczbą chloroplastów w komórkach szparkowych a poziomem poliploidalności czternastu taksonów *Achillea* L. Herba Pol. 17: 200-208.
- Dąbrowska J. (1989): The chromosome numbers of several taxa of the genus *Achillea* L. Acta Soc. Bot. Pol. 58, 2: 163-177.
- Dąbrowska J. (1992): Chromosome number and DNA content in taxa of *Achillea* L. in relation to the distribution of the genus. Acta Univ. Wratisl. Pr. Bot. 49.
- Ellerström S. (brak daty): Cytological techniques. Maszyn. Ed. Svalöf.
- Murin A. (1960): Substitution of cellophane for glass covers to facilitate preparation on permanent squashes and smears. Stain Technol. 35, 6: 351-353.

OBSERVATION OF MITOSIS

S u m m a r y

Author proposes garlic (*Allium* sp.) as useful to observations of mitosis (squash method and staining with orcein) and gives remarks connected with method and importance of karyological data in different fields, for example in ecology.