



wane są dyskusji i krytyce. Tak więc zagadnienie promieniowania mitogenetycznego pozostaje nadal otwarte.

Z danych literatury (12, 13, 14, 15, 24, 23, 30) można przytoczyć liczne przykłady świadczące o tym, że dzielące się komórki tkanek roślinnych i zwierzęcych, komórki mikroorganizmów oraz płyny ustrojowe i soki tkankowe mogą być źródłem promieniowania mitogenetycznego. Według Gurwicza (14) promieniowanie to działa na podziały komórkowe.

Spośród mikroorganizmów najprzydatniejsze ze względu na wysoką czułość okazały się kultury drożdży zastosowane do badań promieniowania mitogenetycznego przez Barona (2). Po naświetleniu mitogenetycznym komórki drożdży wykazują zwykle znaczne różnice w pączkowaniu. Z nowszych publikacji dotyczących badań promieniowania mitogenetycznego za pomocą kultur drożdży można wymienić prace Rylskiej (24, 25). Autorce udało się wykazać efekt mitogenetyczny drożdży *S. cerevisiae* var. *elipsoideus*, rasy Duoro Muscatello. Zależnie od czasu inkubacji wartości efektu były dodatnie lub ujemne. Ilustracją efektu była krzywa kształtu sinusoidy, charakterystyczna dla typowych reakcji bodźcowych przebiegających w żywych organizmach.

Niektórzy badacze podają, że różne odmiany, rasy i szczepy drożdży reagują silniej lub słabiej na naświetlanie mitogenetyczne (3, 14, 24, 26). Stąd można wnosić, że intensywność reakcji na naświetlanie mitogenetyczne jest swoistą cechą określonych szczepów drożdży.

Należy podkreślić, że pod względem przydatności do badań w zakresie promieniowania mitogenetycznego tylko nieliczne szczepy drożdży zostały przebadane. W związku z tym w pracy niniejszej głównym założeniem o charakterze ogólnym było badanie pączkowania komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, rasy piekarnianej „AS” naświetlanych poprzez kwarc kulturą drożdżową tego samego szczepu w celu stwierdzenia efektu mitogenetycznego i określenia na tej podstawie przydatności tego szczepu do badań w zakresie omawianego problemu. Podczas pracy wyłoniły się dwa dalsze, bardziej szczegółowe zagadnienia, wnoszące pewną treść rozwojową do pierwotnie postawionego założenia. Pierwsze dotyczące części metodycznej, w której chodziło o stwierdzenie czy ocena wizualna wielkości pączków według metody opisanej przez Gurwicza (14), jest dokładna i odpowiada rzeczywistości; drugie w jakim czasie po naświetleniu mitogenetycznym inkubowany szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, rasy piekarnianej „AS” wykazuje najintensywniejszą reakcję na to naświetlanie.

## Materiał

Do badań stosowano kultury drożdży *Saccharomyces cerevisiae* Hansen rasy piekarnianej „AS”<sup>1)</sup>. [Nazwę gatunku drożdży podano według współczesnej nomenklatury systematycznej J. Loddera i N. J. Kreger-Van Rij (18), oraz według pracy J. Marszewskiej-Ziemieckiej, (19)]. Komórki tych drożdży mają kształt owalny a pączkowanie ich odbywa się z reguły na biegunach bardziej odległych od siebie. Cecha ta ma praktyczne znaczenie, bo podczas liczenia pączkujących komórek z góry wiadomo, gdzie należy szukać wyrastających pączków. W rezultacie znacznie skraca to czas ich liczenia. Rasy o kulistym zarysie komórek nie mają w ten sposób zdefiniowanych miejsc pączkowania, w związku z czym wyszukiwanie, zwłaszcza najmłodszych pączków, zajmuje dużo czasu.

## Metoda i warunki doświadczeń

Ponieważ obiektem badań efektu i zarazem źródłem promieniowania mitogenetycznego był nowy, nie poznany pod tym względem szczep drożdży *S. cerevisiae* Hansen, rasy piekarnianej „AS”, dlatego stosowana metoda musiała być ostro sprecyzowana, a wszelkie naruszające się wątpliwości i nieścisłości były krytycznie rozpatrywane i w miarę możliwości rugowane.

W pracy zastosowano metodę opisaną przez Gurwicza (14) i Rylską (24), którą z przyczyn wyżej podanych zmodyfikowano i zastosowano do badań w sposób następujący:

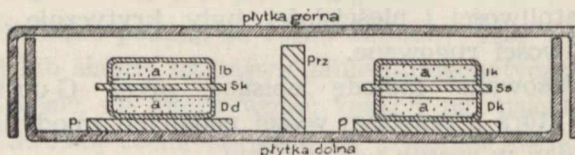
1. Przygotowanie pożywek, hodowli wyjściowych (dwutygodniowe kultury drożdży na agarze) i „szczepów roboczych” (24 godzinne kultury drożdży na agarze), wykonywano wg Gurwicza (14) i Rylskiej (24).
2. Komora wilgotna do hodowli kultur. Komorę (ryc. 1). stanowiła płytką Petriego o średnicy 10 cm. i wysokości krawędzi 2 cm. Wewnątrz komorę przedzielono na dwie połowy luźno wstawioną ścianką z szyby szklanej grubości 5 mm. Ściankę w razie potrzeby można było łatwo wyjmować. Przegrodę wstawiano tylko na okres od rozpoczęcia naświetlania do zakończenia inkubacji kultur po naświetlaniu. Ponieważ ścianka była niższa od krawędzi dolnej części płytki o  $\pm 2$  mm, po przykryciu górną płytką tworzyła się szczelina, przez którą kontakt obu części komory był zapewniony. Celem podtrzymania wilgotności powietrza, na dno komory dawano nieco wody. W ten sposób kultury po obu stronach przegrody miały

<sup>1)</sup> Prof. Dr Stanisławowi Bujakowi, Kierownikowi Katedry Technologii Rolnej WSR w Lublinie, uprzejmie dziękuję za dostarczenie mi kultury tych drożdży.



wyrównany dostęp powietrza, światła i wilgoci. Szklana przegroda zabezpieczała od wzajemnego oddziaływania mitogenetycznego.

3. Sporządzanie detektorów i induktorów drożdżowych. Płytki Petriego o średnicy 2 cm. i głębokości 0,5 cm napelniano gorącą pożywką agarową w ten sposób, aby po zestaleniu powierzchnia pożywki znajdowała się około 0,5—1 mm poniżej górnej krawędzi płytki. Następnie ze „szczepu roboczego” pobierano eż 3 krople nalotu, przenoszono do próbówki z 10 ml brzeczki i dokładnie wytrząsano 10 minut, aż do wytworzenia równomiernej zawiesiny. Pipetą pobierano 2 ml zawiesiny i наносzono po 0,25 ml na zestaloną na płytkach pożywkę agarową. Po 2 minutach brzeczka odsączała paskiem bibuły. Płytki z zasianymi drożdżami przenoszono do wilgotnej komory, którą wstawiano do termostatu. Inkubacja trwała dokładnie 14 godzin w temperaturze 23—25°. Po upływie 14 godzin inkubacji do komory wstawiano przegrodę. Następnie te płytki, w których powierzchnię pożywek pokrywał biały równomierny nalot drożdży, przeznaczano losowo na kultury doświadczalne i ustawiano po jednej stronie przegrody. Po drugiej stronie w analogiczny sposób ustawiano kultury kontrolne.



Ryc. 1. Naświetlanie detektorów drożdżowych; Prz. — przegroda szklana, I. d. — induktor doświadczalny, I. k. — induktor kontrolny, D. d. — detektor doświadczalny, D. k. — detektor kontrolny, S. k. — szybka kwarcowa, S. s. — szybka szklana, P. — podstawka, a. — pożywka agarowa z rosnącymi na powierzchni drożdżami. Irradiation of yeast culture (detector); płytka górna — top dish, płytka dolna — bottom dish, Prz. — glass partition, I. d. — inductor, I. k. — control inductor, D. d. — detector, D. k. — control detector, S. k. — quartz plate, S. s. — glass plate, P. — base, a. — agar surface with yeast

4. Naświetlanie (ryc. 1). Płytkę z kulturą drożdży, nazwijmy ją detektorem doświadczalnym lub kulturą doświadczalną, przykrywano szybką kwarcową. Następnie brano inną płytkę z kulturą drożdży (induktor), odwracano ją do góry dnem i nakładano na szybką, pod którą znajdowała się płytka z kulturą — detektorem. Równocześnie w analogiczny sposób innym induktorem drożdżowym naświetlano poprzez szybką szklaną inną kulturę drożdży, którą nazwijmy detektorem kontrolnym lub kulturą kontrolną. Szybki kwarcowe i szklane były jednakowej grubości — 0,75 mm. Ponieważ nad pożywką

było nieco wolnej przestrzeni powietrznej, podczas naświetlania komórki drożdży detektorów i induktorów rosły swobodnie i nie przylegały do szybek. Induktorami naświetlano tylko jeden raz. Naświetlanie we wszystkich doświadczeniach trwało 5 minut.

5. Odległość detektorów od induktorów. Przestrzegano ściśle aby podczas naświetlania odległość między obu powierzchniami z rosnącymi kulturami drożdży wraz z dzielącą je szybką nie przekraczała 2—3 mm. Odległość komórek od szybek wynosiła 0,5—1 mm.
6. Inkubacja detektorów drożdżowych. Po naświetlaniu induktory wraz z szybkami natychmiast usuwano z komory. Detektory z naświetlonymi drożdżami pozostawiano do rośnięcia na tych samych miejscach w komorze aż do chwili zakończenia inkubacji. Czas inkubacji, zależnie od doświadczenia, trwał od 5 do 180 minut.
7. Oświetlenie kultur i zabezpieczenie przed działaniem nadfioletu. Ponieważ Braunstein i Potockaja (5, 6) oraz Rylska (24) podają, że komórki drożdży na świetle dziennym lepiej pączkują, dlatego inkubację kultur prowadzono w termostacie ze szklanymi ścianami zapewniającymi dopływ rozproszonego światła dziennego. Przestrzegano, aby obie połowy komory były oświetlone jednakowo. Grube szklane ściany termostatu (5 mm) oraz ściany komory (1,5 mm) zabezpieczały kultury przed ewentualnym działaniem nadfioletu z zewnątrz.
8. Zabezpieczenie kultur przed zakażeniem. Zwracono uwagę, aby wszelkie czynności podczas przeszczepiania kultur drożdży, sporządzania detektorów i induktorów, naświetlania a także przygotowania preparatów, były wykonywane sterylnie. Przestrzegano również bardzo skrupulatnie sterylności sprzętu, którym posługiwano się w doświadczeniach.
9. Sporządzanie preparatów. Po upływie określonego czasu inkubacji z każdego detektora sporządzano preparaty w następujący sposób. Nalot drożdży zbierano eż i przenoszono do kropli wody destylowanej na szkiełko podstawowe. Z każdego detektora w doświadczeniu 1 zbierano nalot z całej powierzchni płytki i sporządzano po 4 preparaty. W doświadczeniu 2 i 3 detektory dzielono na tyle sektorów, ile było okresów inkubacji. Po zakończeniu właściwego okresu inkubacji zbierano z określonego sektora drożdże i sporządzano po 3 preparaty trwał. Szuszenie, utrwalanie i barwienie preparatów wykonano wg opisu Gurwicza (14) i Rylskiej (24).
10. Przegląd preparatów.
  - a) Klasyfikacja komórek. Wszystkie preparaty szyfrowano i do przeglądu pobierano losowo. Podczas liczenia komórek

nie było wiadomo z jakiego detektora preparat jest sporządzony. Z szyfrem zapoznawano się po zakończeniu obliczeń preparatów z całego doświadczenia. Preparaty przeglądano w mikroskopie ROW ze stolikiem krzyżowym. Stosowano immersję podwójną i powiększenie  $1700\times$  (ok.  $17\times$ , ob.  $100\times$ ).

Komórki pączkujące klasyfikowano wizualnie zależnie od wielkości pączków a następnie zaliczano do odpowiedniego typu. Ponieważ Gurwicz (13) podaje, że efekt mitogenetyczny zwykle wykazuje się dla komórek o pączkach mniejszych od  $1/3$  komórki macierzystej, przyjęto następującą zasadę klasyfikacji. Komórki nie pączkujące stanowiły typ O. Komórki o pączkach mniejszych od  $1/3$  komórki macierzystej zaliczano do typu I, komórki o pączkach wielkości od  $1/3$ — $2/3$  komórki macierzystej zaliczano do typu II, komórki o pączkach większych od  $2/3$  wielkości komórki macierzystej zaliczano do typu III.

- b) Sposób liczenia komórek. W polu widzenia mikroskopu — zgodnie z przyjętą zasadą klasyfikacji — liczono wszystkie komórki ułożone pojedynczo. Formy nietypowe odbiegające wyraźnie kształtem i rozmiarem od normalnych oraz kolonie komórek opuszczano. Z każdego pola widzenia wynotowywano kolejno liczbę komórek właściwego typu.

W każdym preparacie obliczano 2000 komórek. Według Gurwicza (14) i Rylskiej (24) taka liczba komórek jest wystarczająca do stwierdzenia efektu.

11. Obliczanie efektu. Efekt obliczano dla komórek o pączkach mniejszych od  $1/3$  komórki macierzystej. Zgodnie z Gurwiczem (12, 13, 14, 15) efektem aktualnym nazwano różnicę w liczbie dzielących się komórek między dwoma porównywanymi kulturami (doświadczalną i kontrolną) w chwili utrwalania preparatu. Efekt obliczano dla średniej arytmetycznej według wzoru  $100 \cdot (D-K)/K$  gdzie D oznacza średnią arytmetyczną komórek drożdży detektorów doświadczalnych, K — kontrolnych.
12. Opracowanie statystyczne. Znamienność efektu stwierdzono przez zastosowanie testu t Studenta dla prób niezależnych (10, 11, 22).  
Wartości testowe empiryczne porównano z testowymi wartościami teoretycznymi odczytanymi z tablic Fishera i Yatsa (9). Efekt uznawano za istotny, gdy wartość funkcji testowej empirycznej była większa od wartości funkcji testowej teoretycznej.



## OPIS DOSWIADCZEN

1. Sprawdzenie metody i przydatności drożdży piekarnianych do badań mitogenetycznych.

W doświadczeniu tym, które potraktowałem jako próbne, chodziło o stwierdzenie domniemanego efektu pączkowania pod wpływem naświetlania mitogenetycznego poprzez kwarc. Doświadczenie miało 3 warianty: 1 — kultury naświetlane poprzez kwarc, 2 — kultury naświetlane poprzez szkło, 3 — kultury nie naświetlane. Każdy wariant powtórzono trzykrotnie. Kultury nie naświetlane założono celem przekonania się, czy kultury naświetlane przez szkło mogą być uważane za kontrolne. Wyniki zestawiono w tab. 1.

Tab. 1. Porównanie pączkowania komórek drożdży w kulturze naświetlanej poprzez szkło i nie naświetlanej  
Comparison of the budding of yeast cells in a culture irradiated through a glass plate and not irradiated

Data	Czas naświetlania	Czas inkubacji	Rodzaj doświadczenia	Powtórzenie			Suma	Średnia	Efekt $\frac{(D-K)100}{K}$	Wartość funkcji testowej t Studenta	
				1	2	3				t <sup>0</sup>	t <sup>0,05</sup>
16.8.54	5'	120'	szkło	240	247	233	720	240,00	+0,42	+0,210	±2,776
			nienaśw.	244	236	237	717	239,00			

Minimalne i nieistotne różnice wskazują (tab. 1), że pączkowanie komórek drożdży w detektorach indukowanych poprzez szkło i w ogóle nie indukowanych jest niemal identyczne. Zatem w dalszych doświadczeniach kultury naświetlane poprzez szkło można było uważać z całą pewnością za próby kontrolne.

W tab. 2 zestawiono wyniki dotyczące pączkowania komórek drożdży w detektorze doświadczalnym, naświetlanym poprzez kwarc i kontrolnym, naświetlanym poprzez szkło.

Jak widać z tab. 2 liczba komórek pączkujących w kulturze indukowanej poprzez kwarc jest wyższa od kontroli średnio o 20,83%.

Wyniki te budziły jednakże następujące zastrzeżenia. W trakcie obserwacji pączkujących komórek stwierdzono, że pączki wielu z reguły typowych komórek są mniej lub więcej wydłużone. W zarysie pączki tych komórek miały kształt silnie spłaszczonej elipsy. Ponieważ przy bezpośrednim szacowaniu wielkości pączków prawie zawsze porównuje się dłuższe osie pączków i komórek macierzystych, w wielu przypadkach taki kształt pączka pozornie może pomniejszać jego wielkość rzeczywi-

Tab. 2. Porównanie pączkowania komórek drożdży w kulturze naświetlanej poprzez kwarc i szkło

Comparison of the budding of yeast cells in a culture irradiated through quartz and glass

Data	Czas naświetlania	Czas inkubacji	Rodzaj doświadczenia	Powtórzenie			Suma	Średnia	Efekt (D-K)100 K	Wartość funkcji testowej t Studenta	
				1	2	3				t <sup>0</sup>	t <sup>0,05</sup>
				16.8.54	5'	120'				kwarc	279
			szkło	235	247	238	720	240,00			

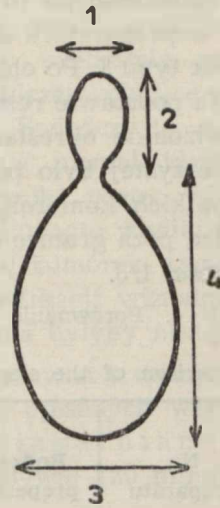
stą. Stwierdzono, że przy wizualnym szacowaniu komórek do grup o określonej wielkości pączków (do 1/3, około 1/3—2/3 i powyżej 2/3 wielkości komórki macierzystej) szczególnie trudno jest ściśle odróżnić te komórki, których wielkość pączków znajduje się na pograniczu dwóch sąsiednich grup, to znaczy bliskich 1/3 i 2/3 komórki macierzystej. Ponadto zauważono, że wizualna ocena jest zależna od wielu czynników subiektywnych częstokroć nie dających się kontrolować. Dlatego potrzeba dużego doświadczenia i wyspecjalizowania wzroku, aby nabrać wprawy w poprawnym szacowaniu wielkości pączków. Sądzone, że gdyby wizualna ocena wielkości pączków nie była dostateczna, wówczas stwierdzenie efektu mitogenetycznego tym sposobem byłoby bez znaczenia. W związku z tymi uwagami powstało pytanie, czy słuszne jest założenie Gurwicza (13), że efekt mitogenetyczny można wykazać na komórkach, których pączki są mniejsze od 1/3 komórki macierzystej oraz czy ocena wielkości pączków komórek kultur doświadczalnych i kontrolnych jest jednakowa i odpowiada rzeczywistości. Aby dać możliwie wyczerpującą odpowiedź na postawione pytanie, dokonano sprawdzenia oceny wizualnej pączkujących komórek przez równoczesne zastosowanie pomiarów tych komórek.

1. Sposób sprawdzenia. Na preparacie doświadczalnym i kontrolnym zmierzono po 100 komórek zaliczanych wizualnie wg przyjętego sposobu do grup o określonej wielkości pączków. Do pomiarów używano podziałki mikrometrycznej. Mierzono dłuższą i krótszą oś pączków i komórek macierzystych. Sposób pomiaru przedstawia ryc. 2. Ponieważ jak wspomniano komórki i ich pączki miały z reguły zarys elipsy, otrzymane z pomiarów wartości podstawiono do wzoru na pole elipsy (S). Obliczano pole pączka (Sp) i pole komórki macierzystej (Sm). Następnie obliczano stosunek Sp/Sm. Obliczona w ten sposób wielkość pączka jest bliska rzeczywistej wielkości i przedstawia wartość porów-



Ryc. 2. Wykonanie pomiaru pączkującej komórki; 1 — oś krótsza pączka, 2 — oś dłuższa pączka. 3 — oś krótsza komórki macierzystej, 4 — oś dłuższa komórki macierzystej

Measurement of the size of a cell at the moment of bud formation; 1 — minor axis, 2 — major axis, 3 — minor axis of parent cell, 4 — major axis of parent cell



nawczą, zatem można na tej podstawie sprawdzić, czy sposobem wizualnym wielkości pączków szacowano poprawnie. W tab. 3 zestawiono wyniki dotyczące oceny wielkości pączków sposobem wizualnym i oceny kontrolowanej pomiarem.

Tab. 3. Porównanie oceny wielkości pączków sposobem wizualnym z oceną kontrolowaną pomiarem

Dane z 2 preparatów (preparat D i K)

Comparison of the size of buds evaluated by sight and by micrometric ocular, data from two preparations D and K

Nr preparatu	Rodzaj preparatu	Liczba komórek szacowanych wizualnie a następnie mierzonych	Graniczne i średnie wartości stosunku Sp/Sm dla 100 mierzonych komórek	Wartość funkcji testowej testu t Studenta	
				$t^0$	$t^{0,05}$
1 kw	D	100	0,01 — 0,32 0,114	+0,034	±1,960
1 szk.	K	100	0,01 — 0,32 0,111		

Objaśnienia: D — Kwarc

K — Szkło

2. Sposób sprawdzenia. Ponieważ z dotychczasowych badań nad stwierdzeniem aktualnego efektu mitogenetycznego metodą drożdżową nie wiadomo dokładnie, w jakim stopniu wyniki efektu zależą od sposobu i poprawności wizualnej klasyfikacji pączkujących komórek, dla pewności, czy na innych preparatach otrzymanoby wyniki podobne do poprzednich, dodatkowo przebadano 10 preparatów doświadczalnych i 10 kontrolnych. Na każdym preparacie szacowano wizualnie a następ-

nie zmierzono po 10 komórek w taki sam sposób jak poprzednio. W sumie w preparatach doświadczalnych i kontrolnych zmierzono po 100 komórek typu I. Po obliczeniu stosunku  $Sp/Sm$  wyniki zestawiono w tab. 4.

Na podstawie rezultatów zestawionych w tab. 3 i 4 można powiedzieć, że wizualne określanie wielkości pączków mniejszych od  $1/3$  komórki macierzystej było poprawne. Jak widać wartości stosunku  $Sp/Sm$  dla wszystkich komórek, tak doświadczalnych jak i kontrolnych, nie wychodzą poza granice określone wizualnie dla tego typu i nie przekraczają wartości  $1/3$ .

Tab. 4. Porównanie oceny wielkości pączków sposobem wizualnym z oceną kontrolowaną pomiarem  
Comparison of the size of buds evaluated visually and by a micrometric ocular

Nr preparatu	Rodzaj preparatu	Liczba komórek szacowanych wizualnie a następnie mierzonych	Graniczne wartości stosunku $\frac{Sp}{Sm}$	Wartość funkcji testowej testu t Studenta	
				$t^0$	$t^{0,05}$
1 kw	D	10	0,02 — 0,19	+0,452	±2,101
1 szk	K	10	0,01 — 0,24		
2 kw	D	10	0,01 — 0,21	+0,088	±2,101
2 szk	K	10	0,02 — 0,27		
Kw I—1	D	10	0,04 — 0,20	+0,203	±2,101
szk I—1	K	10	0,03 — 0,24		
K 3 — 2	D	10	0,03 — 0,19	-0,316	±2,101
S 3 — 2	K	10	0,03 — 0,18		
Kw VI—1—1	D	10	0,04 — 0,25	-0,329	±2,101
Szk V—2	K	10	0,05 — 0,32		
Kw — C	D	10	0,02 — 0,25	+0,285	±2,101
Sz — b	K	10	0,02 — 0,16		
Kw — a	D	10	0,03 — 0,18	-0,456	±2,101
Sz — d	K	10	0,03 — 0,24		
K 1 — 1	D	10	0,06 — 0,24	+0,371	±2,101
S 1 — 1	K	10	0,02 — 0,22		
Kw	D	10	0,03 — 0,17	+0,365	±2,101
Szk	K	10	0,03 — 0,13		
1 Kw 1	D	10	0,03 — 0,19	-0,426	±2,101
Sz — 2	K	10	0,08 — 0,21		
Całość	D	100	0,01 — 0,32	+0,092	±1,960
	K	100	0,01 — 0,32		

Objaśnienia: D — Kwarc

K — Szkło

Otrzymane z pomiarów wyniki przeanalizowano metodą statystyczną stosując test t Studenta. Jak widać (tab. 3, 4) wyniki analizy statystycznej nie wykazały istotnych różnic między wielkością pączków w liczbie komórek drożdży typu I kultur doświadczalnych i analogicznych typów komórek drożdży kultur kontrolnych. Świadczy to, że ocena komórek w obu porównywanych kulturach była niemal identyczna. Stwierdzenie tej zgodności daje pewność, że wyniki oceny wizualnej były poprawne i powtarzalne, a nieprzypadkowe. Ponadto wyniki z opracowania statystycznego wykazują, że pomiar 200 komórek typu I był wystarczający dla sprawdzenia poprawności klasyfikacji wizualnej. Zasadnicze rezultaty wynikające z tego doświadczenia byłyby następujące:

a) Zmodyfikowana metoda drożdżowa jest poprawna i nadaje się do wykazania efektu pączkowania, przy zachowaniu opisanych warunków.

b) Drożdże *S. cerevisiae* Hansen, rasy piekarnianej „AS” wykazują istotny efekt o znaku dodatnim po upływie 120 minut inkubacji od czasu naświetlenia.

b) Ponieważ pączkowanie komórek naświetlanych przez kwarc różniło się od pączkowania komórek analogicznych kultur drożdży naświetlanych przez szkło, zatem kultury tych drożdży stanowiły źródło promieniowania działającego przez kwarc. Kultury te były dostatecznie czułe na działanie promieniowania, czego dowodem jest również stwierdzony efekt.

2. Reakcja drożdży *S. cerevisiae* Hansen, rasy piekarnianej „AS” na naświetlanie mitogenetyczne i jej zależność od czasu inkubacji.

W poprzednim doświadczeniu stwierdzono efekt po 120 minutach inkubacji. Wynik ten stał się zachętą do kontynuowania następnych doświadczeń, których celem było stwierdzenie takiego czasu inkubacji, w którym nasilenie reakcji drożdży na naświetlanie mitogenetyczne będzie maksymalne. Intensywność reakcji określono na podstawie wartości efektu.

Wykonane były dwa następujące doświadczenia:

W pierwszym doświadczeniu zastosowano 60-minutowe odstępy czasu inkubacji. Detektory drożdżowe naświetlano 5 minut a następnie inkubowano 60, 120 i 180 minut. Po upływie każdego z wymienionych okresów inkubacji z kultur drożdżowych sporządzano preparaty trwałe. Przeгляд preparatów, klasyfikację i obliczanie komórek wykonano w sposób podany w doświadczeniu pierwszym.

Warunki i wyniki doświadczenia ilustrują tab. 5 i ryc. 3. Na podstawie wartości efektu można stwierdzić, że w pączkowaniu komórek detektorów doświadczalnych i kontrolnych po 60 i 180 minutach inkubacji nie ma wyraźniejszych różnic. Natomiast po 120 minu-



tach inkubacji — podobnie jak w poprzednim doświadczeniu — stwierdzono istotną różnicę w pączkowaniu komórek i wykazano, że efekt ma znak dodatni. Jednakże należy podkreślić, że ze względu na zbyt długie 60-minutowe odstępy czasu inkubacji wyniki te nie dają pełnego obrazu intensywności reakcji komórek na naświetlanie i wpływu czasu inkubacji na efekt mitogenetyczny. Sądzono, że skrócenie odstępów czasu

Doświadczenie serii 2

dnia 10.X.1955

czas naświetlania 5'

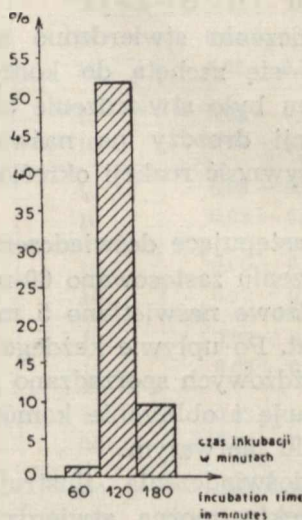
Lot 2, Oct. 10.1955 time of exposure 5'

Tab. 5. Zależność efektu mitogenetycznego od czasu inkubacji  
Dependence of mitogenetic effect on the length of time of incubation

Czas inkubacji	Rodzaj doświadczenia	Powtórzenie			Suma	Średnia	Efekt $\frac{(D - K) \cdot 100}{K}$	Wartość funkcji testowej t Studenta	
		1	2	3				$t^0$	$t^{0,05}$
60'	D	259	264	254	777	259,00	+ 2,37	+ 1,872	2,776
	K	252	256	250	758	252,67			
120'	D	411	391	397	1199	399,67	+52,67	+18,325	2,776
	K	254	270	262	786	262,00			
180'	D	715	685	661	2061	687,00	+ 9,39	+ 2,466	2,776
	K	614	664	607	1885	628,33			

Objaśnienia: D — Kwarc

K — Szkło



Ryc. 3. Zależność efektu mitogenetycznego od czasu inkubacji  
Dependence of mitogenetic effect on the length of time of incubation

inkubacji pozwoli lepiej uwydatnić zależność znaku i wartości efektu od czasu inkubacji.

Doświadczenia serii 5

dnia 29.X.1956 r.

czas ekspozycji 5'

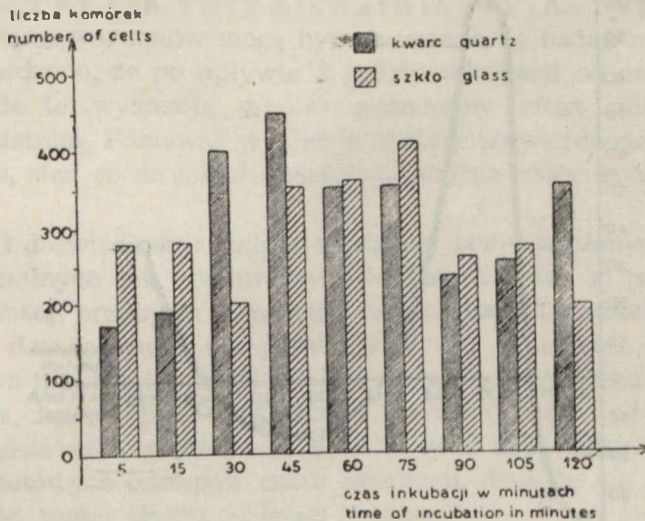
Lot 3, Oct. 29.1956 after 5 seconds exposure

Tab. 6. Zależność efektu mitogenetycznego od czasu inkubacji  
Dependence of mitogenetic effect on the length of time of incubation

Czas inkubacji	Średnia z 6 powtórzeń		$\bar{x}_D - \bar{x}_K$	Efekt (D - K - 100)	Wartość funkcji testowej t Studenta	
	D	K		K	$t^0$	$t^{0,05}$
5'	177,0	281,0	-104,0	- 37,01	-10,498	2,571
15'	193,0	286,0	- 93,0	- 32,52	-24,225	2,228
30'	407,0	203,0	+204,0	+100,50	+32,199	2,571
45'	452,0	358,0	+ 94,0	+ 26,26	+ 5,734	2,571
60'	351,0	362,0	- 11,0	- 3,04	- 0,604	2,228
75'	353,0	412,0	- 59,0	- 14,32	- 3,751	2,228
90'	228,0	255,0	- 27,0	- 10,20	- 2,154	2,228
105'	251,0	272,0	- 21,0	- 7,32	- 1,592	2,571
120'	353,0	186,0	+167,0	+ 36,02	+ 3,828	2,571

Objaśnienia: D — Kwarc

K — Szkło



Ryc. 4. Porównanie pączkowania komórek drożdży w kulturach indukowanych , poprzez kwarc i kontrolnych (szkło)

Comparison of the budding cells in yeast cultures irradiated through quartz and glass (control)

Dla definitywnego rozstrzygnięcia zagadnienia wykonano drugie doświadczenie. Warunki doświadczenia i wyniki przedstawiono w tabeli 6 i na ryc. 4.

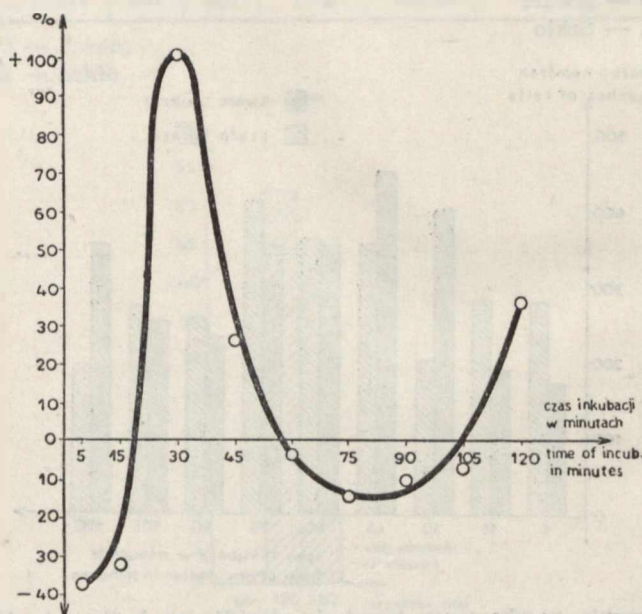
Z ryc. 4 widać, że najwięcej komórek z pączkami mniejszymi od  $1/3$  komórki macierzystej stwierdzono w kulturach doświadczalnych po 45 minutach, a w kulturach kontrolnych po 75 minutach inkubacji.

Reakcja komórek na naświetlanie mitogenetyczne była intensywniejsza w początkowym okresie inkubacji. Maksimum nasilenia przypada na czas od 5 do 45 minut po naświetlaniu.

Jak widać cykl pączkowania drożdży naświetlanych poprzez kwarc i szkło przebiega w dwóch niezależnych od siebie rytmach. Świadczą o tym charakterystyczne wartości ekstremalne stwierdzone po 5, 30—45 i 120 minutach inkubacji.

Zależność znaku i wartości efektu mitogenetycznego od czasu inkubacji ilustruje ryc. 5. Z przebiegu krzywej widać, że po 30, 45 i 120 minutach od czasu naświetlania wartości efektu są dodatnie. W innych okresach inkubacji efekt ma znak ujemny.

W stosowanych warunkach 5-minutowe naświetlanie mitogenetyczne poprzez kwarc wywołuje po 5 minutach inkubacji maksymalny efekt



Ryc. 5. Zależność efektu mitogenetycznego od czasu inkubacji  
Dependence of mitogenetic effect on the length of time of incubation



o znaku ujemnym. Natomiast maksymalny efekt o znaku dodatnim jest charakterystyczny dla czasu 30 i 120 minut po naświetleniu.

Wyniki analizy statystycznej wykazują, że efekt jest istotny po 5, 15, 30, 45, 75 i 120 minutach. Należy podkreślić, że szczególnie istotny efekt stwierdzono po 5, 30, 45 i 120 minutach inkubacji. Nie stwierdzono efektu w czasie 60, 90 i 105 minut. Wnioski z tej serii doświadczeń byłyby następujące:

1. Intensywność reakcji drożdży *S. cerevisiae* Hansen, rasy piekarnianej „AS” na naświetlanie mitogenetyczne zmienia się zależnie od czasu inkubacji. Maksimum nasilenia przypada na początkowy okres inkubacji.

2. Stwierdzono wyraźną zależność wartości i znaku efektu od czasu inkubacji.

3. Celem wykazania efektu od czasu inkubacji dla drożdży *S. cerevisiae* Hansen, rasy piekarnianej „AS” oprócz opisanych warunków, trzeba stosować krótkie 15 minutowe odstępy czasu inkubacji w ciągu 2 godzin od zakończenia naświetlania.

4. Obrazem zależności efektu mitogenetycznego od czasu inkubacji jest charakterystyczna krzywa kształtu sinusoidy.

#### DYSKUSJA

Ocena wyników doświadczenia 1 (tab. 2) wykazuje, że drożdże *S. cerevisiae* Hansen, rasy piekarnianej „AS” przy przestrzeganiu opisanych warunków mogą być stosowane do badań mitogenetycznych. Stwierdzono, że po upływie 2 godzin inkubacji od czasu naświetlenia drożdże te wykazują wysoce znamienne efekt mitogenetyczny o znaku dodatnim. Ponieważ wyniki te zostały potwierdzone w doświadczeniu 2 i 3, stąd co do ich słuszności nie można mieć specjalnych zastrzeżeń.

Wyniki 2 doświadczenia (tab. 5) nasuwały przypuszczenie, że zarówno w doświadczalnych jak i kontrolnych kulturach wraz z przedłużeniem okresu inkubacji przybywa komórek z najmniejszymi pączkami. Jednakże rezultaty 3 doświadczenia nie potwierdziły tej zależności. Stwierdzone w 3 okresach inkubacji wartości efektu mogą służyć wyłącznie jako dane orientacyjne, informujące o zależności wartości efektu od czasu inkubacji. Jednakże ze względu na stosowanie w 2 doświadczeniu zbyt długich 60-minutowych odstępów czasu inkubacji, dane te nie dają pełnego obrazu zmian znaku efektu od czasu inkubacji.

Rezultaty doświadczenia 3 (tab. 4) wykazują, że zależność znaku i wartości efektu od czasu inkubacji można stwierdzić, jeśli odstępy czasu inkubacji zostaną skrócone do 15 minut, przy czym dla otrzymania całkowitego obrazu zmian, badania efektu należy kontynuować

w ciągu 2 godzin inkubacji. Charakterystyczna dla tej zależności sinusoidea (ryc. 5) w pewnym stopniu nawiązuje do wyników otrzymanych przez Rylską (24) dla drożdży *S. cerevisiae* Hansen, var. *elipsoideus*, rasy Duoro-Muscattello.

Nagle skoki krzywej oraz charakterystyczna zmiana znaku i wartości efektu w czasie inkubacji od 5 do 30 minut świadczą o tym, że albo bodziec działa bardzo intensywnie, albo komórki badanych drożdży są wysoce wrażliwe na naświetlanie mitogenetyczne. Jest rzeczą niewątpliwą, że sytuacja taka wytworzyła się w następstwie indukcji mitogenetycznej. Przedstawione wyniki nie dają innych podstaw do tłumaczenia tych zmian.

W trzech badanych okresach inkubacji: 60, 90 i 105 minut — nie stwierdzono efektu.

Prawdopodobnie zanik efektu był spowodowany okresowym wahaniami pewnych faz wzrostu pączków u tych komórek, które reagują na bodziec mitogenetyczny. W rezultacie tych wahań, zakłócony indukcją mitogenetyczną rytm pączkowania komórek osiągnął punkty styczne z kontrolą, a efekt w okresie inkubacji 60, 90 i 105 minut nie ujawnił się. Okresowe pojawienie się i zanik efektu świadczy zatem o odmiennym rytmie pączkowania komórek kultury doświadczalnej i kontrolnej. Natomiast na pytanie, które fazy wzrostu pączków ulegają wahaniom, przytoczone rezultaty nie dają wyraźnej odpowiedzi. Prawdopodobnie na działanie mitogenetyczne komórki reagują najsilniej w początkowej fazie wzrostu, gdy pączki są młode. Za tego rodzaju poglądem przemawiają wyniki badań Favreta i Roseblita (8). Badacze ci stwierdzili, że właściwy proces, w którego wyniku pojawia się efekt, zachodzi w powolnej fazie wzrostu („lag phase”), bądź też w fazie logarytmicznej („log phase”). Proces ten ma polegać na szybszym wzroście i skróceniu faz.

Według Gurwicza natomiast (13) efekt mitogenetyczny, czyli pojawienie się w stosunku do kontroli znacznej przewagi bardzo małych pączków (mniejszych od 1/3 komórki macierzystej) w kulturze indukowanej, jest następstwem albo przyspieszenia albo zahamowania podziału i dlatego najlepiej można wykazać efekt na komórkach o najmłodszych pączkach.

Pojawienie się oraz wartość efektu, jak podają inni badacze, zależy w głównej mierze od wieku kultur drożdżowych pełniących rolę induktorów. Tylko młode, intensywnie dzielące się komórki drożdżowe mogą być źródłem promieniowania mitogenetycznego (2, 3, 4). Kultury stare nie są zdolne do wywołania zmian w pączkowaniu (24). Ponieważ do naświetlania we wszystkich doświadczeniach niniejszej pracy jako induktorów używano wyłącznie 14-godzinnych kultur drożdżowych,

a w wyniku naświetlania w określonych odstępach czasu inkubacji otrzymywano stale istotne efekty pączkowania (wpływ jakichkolwiek czynników chemicznych był wykluczony), zatem kultury te stanowiły niewątpliwie czynne źródło mitogenetyczne.

We wszystkich doświadczeniach niniejszej pracy po upływie 2 godzin inkubacji drożdży od czasu naświetlania stwierdzono znamienny efekt o znaku dodatnim. Wyniki te były nieoczekiwane i zarazem zastanawiające.

Z jednej strony niezupełnie zgadzały się one z danymi Kurajewa, Sałkinda i Gurwicza. Kurajew podaje (cyt. wg Gurwicza, 14), że wraz z upływem czasu inkubacji efekt słabnie i po 2 godzinach zanika całkowicie. Natomiast wg Sałkinda (26, 28) i Gurwicza (14) najlepiej można wykazać efekt natychmiast po naświetlaniu lub po 3—5 minutach. Z drugiej strony wyniki otrzymane w niniejszej pracy nawiązywały do danych Rylskiej (24) Favreta i Rosemblita (8) oraz Arroyo (1). Spośród wymienionych autorów Rylska (24) stwierdziła istotny efekt o znaku ujemnym dla drożdży *S. cerevisiae* var. *elipsoideus* rasy Duoro Muscatello po 2 godzinach inkubacji. Favret i Rosemblit (8) stwierdzili, że drożdże *S. cerevisiae* (bliższego oznaczenia systematycznego nie podają) zależnie od czasu naświetlania wykazują efekt po 3—5 godzinach inkubacji. Arroyo (1) stwierdził dla *S. pombe* efekty dodatnie, przewyższające kontrolę 15—20 razy — nawet po 30—36 godzinach inkubacji.

Należy wspomnieć, że niektórym badaczom nie udało się wykazać efektu mitogenetycznego u drożdży w ogóle (20, 23, 30).

Wielu badaczy, działając na drożdże różnymi źródłami promieniowania o intensywności mitogenetycznej, stwierdziło wyraźne efekty mitogenetyczne. Konarski (16), działał na kulturę drożdży *S. cerevisiae* (systematycznie bliżej nie określone) nadfioletem ze specjalnie skonstruowanej lampy kwarcowej. Stwierdzony przez tego badacza dodatni efekt mitogenetyczny był wywołany promieniowaniem o długości fali 2038—2465 Å.

Podobne wyniki otrzymali Chariton, Frank i Kannegiesser (cyt. wg Rahna, 21). Badacze ci stwierdzili, że w zakresie długości fal 2060—1650 Å efekt był dodatni a w zakresie 2700—3650 ujemny.

Siebert (29) zastosował jako źródło promieniowania mitogenetycznego mięśnie i różne reakcje chemiczne. W obu przypadkach drożdże dawały istotny efekt pączkowania (Siebert, cyt. wg Rahna, 21).

Z opisanego przez Rylską (24) sposobu naświetlania wynika, że na czas ekspozycji błoczki agarowe z rosnącą kulturą drożdży (induktor) kładziono na szybki kwarcowe w ten sposób, że komórki drożdży przy-



legały bezpośrednio do szybek. Ponieważ nie wiadomo dokładnie, czy bezpośredni kontakt komórek drożdży ze szkłem i kwarcem nie ma jakiegoś wpływu na proces podziału, a w związku z tym na emisję promieni mitogenetycznych, dlatego w doświadczeniach niniejszej pracy detektory i induktry drożdżowe sporządzano w taki sposób, aby komórki podczas naświetlania nie stykały się z powierzchnią szybek (ryc. 1).

Rezultaty niniejszych badań oraz dane z literatury wykazują, że każda rasa drożdży prawdopodobnie reaguje swoiście na naświetlanie mitogenetyczne. Swoistość reakcji może być modyfikowana różnymi warunkami badań, na przykład: wiekiem kultur drożdżowych, różnymi źródłami promieniowania mitogenetycznego, działaniem źródła promieniowania z różnej odległości, czasem ekspozycji, przyleganiem komórek do szkła i kwarcu, sposobem określania efektu, grubością szybek kwarcowych, pożywkami stałymi albo płynnymi, pH, temperaturą itp. Z tych względów efekt mitogenetyczny otrzymywany przez różnych badaczy, nawet dla jednego i tego samego szczepu drożdży, może być raz zbieżny, innym razem nieporównywalny. Ponieważ w pracy niniejszej wpływu wymienionych czynników na efekt nie badano, zatem nie można z całą pewnością twierdzić, czy istotnie stosowane warunki badań były optymalne dla wykazania maksymalnego efektu. Według wszelkiego prawdopodobieństwa wartości efektu przy zapewnieniu optimum dla każdego warunku wzrosłyby znacznie i uległyby przesunięciu w czasie inkubacji.

Jak widać, proces pojawienia się efektu jest zależny od wielu czynników i może być tłumaczony różnie. Należy podkreślić, że istota tego procesu nie jest dotychczas dokładnie poznana.

Ze względu na możliwość zastosowania drożdży *S. cerevisiae* Hansen, rasy piekarnianej „AS” jako organizmów testowych do badań mitogenetycznych, przebadanie zależności efektu od wyżej wymienionych czynników byłoby bardzo wskazane.

#### STRESZCZENIE I WNIOSKI

W pracy niniejszej badano pączkowanie komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, rasy piekarnianej „AS” naświetlanych poprzez kwarc kulturą drożdżową tego samego szczepu. Drożdże naświetlano w celu stwierdzenia efektu i określenia na tej podstawie intensywności reakcji na działanie mitogenetyczne i przydatności tego szczepu do badań promieniowania mitogenetycznego.

1. Opisano prosty sposób hodowli kultur drożdży i sposób naświetlania eliminujący bezpośredni kontakt komórek ze szkłem i kwarcem.

2. Drożdże *S. cerevisiae* Hansen, rasy piekarnianej „AS” wykazywały najintensywniejszą reakcję na naświetlanie mitogenetyczne w początkowym okresie inkubacji (w czasie od 5 do 45 minut po naświetlaniu).

3. Stwierdzono efekt mitogenetyczny o znaku dodatnim po 120 minutach inkubacji od czasu naświetlania.

4. 5-minutowe działanie mitogenetyczne poprzez kwarc wzmacnia rytmikę pączkowania. Stwierdzone wartości efektu mitogenetycznego dla 2 godzin inkubacji charakteryzują się dwoma ekstremami o znaku dodatnim (30 i 120 minut) i dwoma ekstremami o znaku ujemnym (5 i 75 minut) (ryc. 5). Zmiany w pączkowaniu wywołane naświetlaniem przebiegają rytmicznie.

5. Wyraźną zależność wartości i znaku efektu od czasu inkubacji stwierdzono wówczas, gdy efekt określono w odstępach 15-minutowych w ciągu 2 godzin. Zależności tej nie udało się wykazać przy stosowaniu odstępów jednogodzinnych.

6. Wartość i znak efektu mitogenetycznego zmienia się z upływem czasu inkubacji. Obrazem tej zależności jest sinusoida (ryc. 6).

7. Potwierdzono hipotezę Gurwicza, że efekt mitogenetyczny można wykazać na komórkach o najmłodszych pączkach.

8. Ponieważ pączkowanie drożdży naświetlanych przez kwarc różniło się od pączkowania komórek analogicznych kultur drożdży naświetlanych przez szkło, zatem kultury tych drożdży stanowiły źródło promieniowania działającego przez kwarc. Kultury tych drożdży były także dostatecznie czułe na działanie promieniowania, czego dowodem są stwierdzone efekty. Stąd można wnosić, że drożdże *S. cerevisiae* Hansen, rasy piekarnianej „AS”, mogą być przydatne do badań promieniowania mitogenetycznego.

Panu Prof. dr Adamowi Paszewskiemu wyrażam głęboką wdzięczność i podziękowanie za zainteresowanie mnie problemem i za kierownictwo nad wykonaniem niniejszej pracy. Dziękuję również Pani Doc. Dr Teresie Rylskiej za wiele cennych rad i wskazówek oraz za udostępnienie mi literatury.

#### LITERATURA

1. Arroyo R.: Mitogenetic radiation and processes of fermentation. Sugar, 40, 1, 1945.
2. Baron M. A.: Über mitogenetische Strahlung bei Protisten. Archiv f. Entwickl. Mechn., 108, 617, 1926.
3. Baron M. A.: Analyse der mitogenetischen Induktion und deren Bedeutung in der Biologie der Hefe. Planta, 10, 28, 1930.
4. Baron M. A.: Kontaktnoje deistwie mitogeneticzeskogo pola. Issledowania po Mitogeneticzeskom Izluczeniu, Leningrad 1934.

5. Braunstein A. E., Potockaja A. P.: O specyficznosti spektrow mitogeneticznego izluczenia pri oksilitieno-wozstanowitielnych reakcjach. Issl. po Mit. Izl., Moskwa — Leningrad 1934.
6. Braunstein A. E., Potockaja A. P.: O prirode elementarnych atomofizycznych processow lezajszczich w osnowie mitogeneticznego izluczenia. Issl. po Mit. Izl., Moskwa 1934.
7. Eremiejew W. E.: Mitogeneticzskoje izluczenie i brodilnyje processy. Priroda, 1, 64, 1947.
8. Favret E. A., Rosembliit A.: Efekto mitogenetico de Ustilago maydis y Agrobacterium tumefaciens sobre la levadura. Rev. Arg. Agr., 10, 440, 1949.
9. Fischer and Yates: Statistical Tables. London 1948.
10. Fisz M.: Rachunek prawdopodobieństwa i statystyka matematyczna. Warszawa 1954.
11. Gniedenko B., Chinczyn A.: Elementarny wstep do rachunku prawdopodobieństwa. Warszawa 1954.
12. Gurwitsch A.: Die mitogenetische Strahlung. Berlin 1932.
13. Gurwicz A. G., Gurwicz L. D.: Mitogeneticzskoje Izluczenie. Leningrad 1934.
14. Gurwicz A. i L.: Mitogeneticzskoje Izluczenie, Fizikochimiczeskije osnowy i prilozenia w biologii i medicynie. Moskwa 1945.
15. Gurwicz A. i L.: Wwiedienie w uczenie o mitogenezie. Moskwa 1948.
16. Konarski J.: Longueur d'onde des rayons mitogénétiques. Acta Biol. Exp., 7, 1932.
17. Kroh J.: Mikrochemiluminescencja soli sodowej chloryloaminy kwasu benzenosulfonowego. Łódzkie Tow. Naukowe. sectio III, 25, 1953.
18. Lodder J., Kreger — Van Rij N. J. W.: The Yeasts A Taxonomic Study. North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1952.
19. Marszewska-Zięmięcka J.: Drobnoustroje pożyteczne w życiu codziennym. Książka i Wiedza. Warszawa 1951.
20. Moissejewa M.: Zur Theorie der mitogenetischen Strahlung V. Bioch. Zschr., 281. B/4.—6, 1935.
21. Rahn O.: Mitogenetic Radiation (Gurwitsch radiation). Tabulae Biologicae. Vol. XIV. 1, 1937.
22. Romanowski W.: Zastosowanie statystyki matematycznej w doświadczalnictwie. Warszawa 1951.
23. Rossignol L.: Contribution à l'étude de l'action des radiations sur les microorganismes. Nancy 1946.
24. Rylska T.: Promieniowanie tzw. mitogenetyczne pączkujących drożdży i narośli rakowatej ziemniaka. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C, vol. III, 13, Lublin 1948.
25. Rylska T.: Badania nad mechanizmem działania czynników mitotycznych. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C, vol. V, 10, Lublin 1951.
26. Salkind S. J.: Nieposredstwiwnoje wlijanie mitogeneticzskich łuczej na chod kletocznego dielenia w drożdżowej kulturze. Issl. po Mit. Izl., 1934.
27. Salkind S., Nowikoff M. B.: Über langdauernde Einwirkung mitogenetischer Strahlen auf die Hefezellen. Protoplasma, 26, 1936.
28. Salkind S.: Der Einfluss langdauernder mitogenetischer Bestrahlung auf die Morphologie der Hefezellen. Protoplasma, 27, 1936.



29. Siebert W. W.: Über die mitogenetische Strahlung des Arbeitsmuskels und einiger anderer Gewebe. Bioch. Zschr. 202, 126, 1928.
30. Vlès F.: Introduction à la photochimie biologique. II-c fasc. Les sources naturelles de radiation. Paris 1946.

## Р Е З Ю М Е

Автор занялся исследованием почкования клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Hansen хлебопекарной расы „AS”, облучаемых сквозь кварц дрожжевой культурой этого же штамма. Дрожжи облучивались для установления эффекта и на этом основании определения интенсивности реакции на митогенетическое действие и пригодность этого штамма для исследований митогенетического излучения.

Дрожжи культивировались в течение 14 часов в особых чашках диаметром в 2 см на плотной агаро-сусловой питательной среде, приготовленной по рецепту, разработанному Гурвичем (14) и Рыльской (24). Чашки с культурами дрожжей инкубировались при температуре 23°—25° в специальной стеклянной камере, помещенной в термостате. Колонии дрожжей развивались при рассеянном дневном свете.

Для установления гипотетического митогенетического эффекта 14-дневной культурой дрожжей (детектор) облучивали в течение 5 минут через кварцевую пластинку толщиной в 0,75 мм аналогичную культуру этого же штамма (индуктор), отдаленную от предыдущей на 2—3 мм. Аналогично поступали с контрольными культурами, которые облучивались через стеклянную пластинку. Во время облучивания (Рис. 1) был совершенно исключен контакт клеток со стеклом и кварцом, что является методической новостью. Так как не знаем, не имеет ли какогонибудь влияния на деление клеток непосредственное их прилегание к стеклу и кварцу и в связи с этим на митогенетическое лучеиспускание, автору кажется, что применение упомянутой выше новости находит полное обоснование. После облучения культуры дрожжей (детекторы) инкубировались в течение от 5 минут до 3 часов, в зависимости от характера опыта. По истечении определенного срока инкубации изготовлялись фиксированные препараты, которые затем рассматривались в микроскоп. Были применены двойная иммерсия и увеличение 1700х. На микроскопическом поле зрения подсчитывались все клетки, среди которых визуальным способом в зависимости от стадии развития были выделены 4 типа.

Тип I — клетки с почками меньше 1/3 величины материнской клетки. Тип II — это клетки, величина почек которых составляет от

1/3 до 2/3 величины материнской клетки. Тип III — клетки с почками больше 2/3 величины материнской клетки. Тип 0 — это клетки без почек.

На каждом препарате отсчитано 2000 клеток. Так как Гурвич (14) утверждает, что митогенетический эффект может быть обнаружен на почкующих клетках с самыми молодыми почками, поэтому для определения митогенетического эффекта были взяты лишь клетки типа I (почки меньше 1/3 величины материнской клетки). Для проверки, правильна ли была визуальная оценка величины почек клеток дрожжей, облучаемых через кварц и стекло, в качестве контрольного эксперимента были произведены измерения почкующих клеток типа I. Способ измерений иллюстрирует рис. 2. Для измерений был применен прибор с микрометрическим делением.

Величина почки по сравнению с материнской клеткой т. е. величина отношения почки к материнской клетке определялась на основании формулы:

$$\frac{\text{продольная ось } x \text{ короткую ось почки}}{\text{продольная ось } x \text{ короткую ось материнской клетки}} = \frac{Sp}{Sm}$$

Средние величины отношения  $\frac{Sp}{Sm}$  полученные при оценке контролируемой путем измерений, в сравнении с визуальной оценкой представлены на табл. 2 и 3. Во время контролирования визуальной оценки при помощи измерений автор убедился, что такой контроль весьма затруднителен и необычайно трудоёмок. На основании классификации контролируемой измерениями и статистического анализа материала показано, что визуальная оценка морфологически выделенных почкующих клеток с почками меньше 1/3 величины материнской клетки в обеих сравниваемых культурах дрожжей оказалась почти идентичной. Следовательно примененный метод следует считать вполне правильным.

Автором были поставлены две серии опытов. Первая серия опытов — это проба, целью которой было выявить гипотетический эффект почкования после 120-минутной инкубации с момента начала митогенетического облучения. Целью второй серии экспериментов было обследовать интенсивность реакции дрожжей *S. cerevisiae* на пепс хлебопекарной расы „AS” на митогенетическое облучение.

### Результаты и выводы

1. Описан простой метод выращивания культур дрожжей, а также метод облучения с исключением непосредственного контакта клеток дрожжей со стеклом и кварцем. При помощи измерений устано-

влено, что визуальное оценивание величины почек меньше  $1/3$  величины материнской клетки у дрожжей облучаемых через стекло и кварц оказалось почти идентично (табл. 1 и 2).

2. Дрожжи *Sacchromyces cerevisiae* Hansen хлебопекарной расы „AS” обнаруживали самую интенсивную реакцию на митогенетическое облучение в начальном периоде инкубации (в течение от 5 до 45 минут после облучения, рис. 5). Установлен существенный митогенетический эффект после инкубации, длившейся 120 минут с момента облучения (Табл. 3, 5, 6). Реакция на митогенетическое облучение исследуемого штамма дрожжей, установленная на основании величины эффекта, в общем близка к реакции *S. cerevisiae* Hansen var. *elipsoidens* расы *Duoro muscatello*, изучаемой Рыльской (14). Однако следует подчеркнуть, что дрожжи *S. cerevisiae* Hansen хлебопекарной расы „AS” проявляют существенный митогенетический эффект с положительным знаком еще после 120 минут инкубации.

3. 5-минутное митогенетическое действие через кварц усиливает ритмику почкования. Установленные величины митогенетического эффекта при двучасовой инкубации характеризуются двумя экстремами с положительным знаком (30 и 120 минут) и двумя экстремами с отрицательным знаком (5 и 75 минут) рис. 5. Изменения в почковании вызванные облучением протекают ритмически.

4. Отчетливую зависимость величин и знака митогенетического эффекта от продолжительности инкубации установлено лишь тогда, если эффект определялся в 15-минутных промежутках времени в течение 2 часов. Этой зависимости не удалось установить, при применении 60-минутных промежутков.

5. Величина и знак митогенетического эффекта изменяется в зависимости от продолжительности инкубации. Характер этой зависимости иллюстрирует синусоида (рис. 5).

6. Подтверждена гипотеза Гурвича, что митогенетический эффект можно показать на клетках с самыми молодыми почками.

7. Так как характер почкования клеток исследуемых дрожжей, облучаемых сквозь кварцевую пластинку отличался от почкования клеток аналогичных культур дрожжей, облучаемых сквозь стеклянную пластинку, следовательно культуры этих дрожжей являлись источником лучеиспускания, действующего сквозь кварц. Кроме того культуры этих дрожжей обладали достаточной чувствительностью к действию лучеиспускания, о чем свидетельствуют установленные эффекты. На основании этого можно предположить, что дрожжи *S. cerevisiae* Hansen хлебопекарной расы „AS” могут быть с успехом использованы для исследований митогенетического лучеиспускания.



- Табл. 1. Сопоставление почкования клеток дрожжей в культурах, облучаемых сквозь стеклянную пластинку и необлучаемых.
- Табл. 2. Сопоставление почкования клеток дрожжей в культурах облучаемых сквозь кварц и стекло.
- Табл. 3. Сопоставление оценок величины почек визуальным способом с оценками, контролирурованными путем измерений; данные взяты из 2 препаратов (препараты D и K).
- Табл. 4. Сопоставление оценок величины почек визуальным способом с оценками контролирурованными при помощи измерений.
- Табл. 5. Зависимость митогенетического эффекта от продолжительности инкубации. Серия 2.
- Табл. 6. Зависимость митогенетического эффекта от продолжительности инкубации. Серия 5.
- Рис. 1. Облучение дрожжевых детекторов:  
 płytka górna — верхняя чашечка, płytka dolna — нижняя чашечка, Prz. — стеклянная перегородка, I. d. — индуктор экспериментальный, I. k. — индуктор контрольный, D. d. — детектор экспериментальный, D. k. — детектор контрольный, S. k. — стеклянная пластинка, P. — подставка, а. — агаровая питательная среда с развивающимися на поверхности дрожжами.
- Рис. 2. Способ измерения почкующей клетки;  
 1 — более короткая ось почки, 2 — более длинная ось почки, 3 — более короткая ось материнской клетки, 4 — более длинная ось материнской клетки.
- Рис. 3. Зависимость митогенетического эффекта от продолжительности инкубации.
- Рис. 4. Сопоставление почкования клеток дрожжей в культурах облучаемых сквозь кварц и контрольных (стекло).
- Рис. 5. Зависимость митогенетического эффекта от продолжительности инкубации.

## SUMMARY

The author studied the budding of the yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae* Hansen (strain of baker's yeast, AS) irradiated through a quartz plate with a yeast culture of the same strain. The purpose of irradiation was to demonstrate the mitogenetic effect and to assess from it the intensity of reaction to mitogenetic activity, as well as to assess the applicability of the strain for investigating mitogenetic radiation.

Yeast culture was left to grow for 14 hours, in special dishes 2 cm in diameter, on a wort agar surface prepared according to Gurwitsch (14) and Rylska (24). The dishes with yeast cultures were left to incubate at a temperature of 23°—25°, in a special glass vessel placed in a thermostat. The yeast culture was protected against excessive sunlight.

In order to demonstrate the supposed mitogenetic effect the yeast culture, 14 hours old (detector), was irradiated for 5 minutes through a quartz plate 0.75 mm thick at a distance of 2—3 mm with yeast culture of the same strain (inductor). Control cultures were irradiated

through a glass plate. During the irradiation (Fig. 1) the yeast cells were not allowed to come into direct contact with the quartz and glass, which was a new departure in these investigations. This was justified, as it has not yet been definitely established that the direct contact of yeast cells with quartz and glass has no influence on the mitosis and emission of mitogenetic rays. After irradiation the yeast cultures (detector) were left for incubation for periods of about 5 minutes to 3 hours, depending on the experiment. After incubation fixed preparations were made which were then examined under a microscope with double immersion lenses (1700 X). Under the microscope all the cells were counted. Four morphological types of cells were visually distinguished.

Type I included cells with buds smaller than one third of the size of their parent cells. Type II included cells whose buds ranged from one third to two thirds of the size of their parent cells. In Type III there were cells whose buds were more than two thirds of the size of their parent cells. The type designated 0 had no buds.

In each preparation 2000 cells were counted. Following Gurwitsch's (14) opinion that a mitogenetic effect can be detected in cells with the youngest buds, the author examined cells of type I only. In order to check whether the visual assessment of the size of yeast buds irradiated through quartz and through glass was identical, measurements of yeast buds of type I were made. Fig. 2 shows the way of measurement, with a micrometric ocular. The relation in size of a bud to its parent cell was determined by a formula:

$$\frac{\text{major axis} \times \text{minor axis of bud}}{\text{major axis} \times \text{minor axis of its parent cell}} = \frac{Sp}{Sm}$$

The mean values of  $\frac{Sp}{Sm}$  obtained from calculations with a micrometric ocular and compared with those checked by visual assessment are presented in Tables 2 and 3. After comparing the data the author concluded that the method is difficult and requires much time. The classification of yeast buds by micrometric measurements followed by the application of statistical methods led the author to conclude that the visual assessment of morphologically determined yeast buds (only the smallest buds were considered) in both yeast cultures was almost identical. The results obtained show that the method was used correctly.

In the course of basic examinations 2 series of tests were carried out. The objective of the first series was to demonstrate the supposed effect of bud formation after 120 minutes of incubation, beginning from the moment of exposure. The aim of the second series of experiments

## Conclusions

was to examine the intensity of the reaction of yeast culture caused by mitogenetic irradiation.

1. A simple method of growing yeast cultures was described, together with the method of irradiation, in which yeast cells were not allowed to come into contact with glass and quartz. On the basis of measurements the author concluded that visual evaluations of the size of buds, smaller than 1/3 of their cells, in yeast cultures radiated through quartz and through glass, were almost identical (Tables 1 and 2).

2. The yeast culture *Saccharomyces cerevisiae* Hansen (strain of baker's yeast, AS) showed the most intense reaction during mitogenetic irradiation in the early stage of incubation i. e. from 5—45 minutes after radiation had begun (Fig. 5). The significance of the mitogenetic effect was observed after 120 minutes of incubation (measured from the moment of radiation) (Tables 2, 5, 6). The reaction to mitogenetic radiation of the yeast strain examined, determined by the value of the effect, closely corresponds to data concerning the reaction of *S. cerevisiae* Hansen var. *elipsoideus*, strain Duoro Muscatello, observed by Rylska (14). The difference is that yeast *S. cerevisiae* Hansen produces a significant, positive mitogenetic effect even after 120 minutes of incubation.

3. Mitogenetic activity of yeast culture, for 5 minutes, through quartz plate, increases the frequency of bud formation. Two extreme positive values (30 and 120 minutes) and two extreme negative values (5 and 75 minutes) (Fig. 5) are characteristic of the mitogenetic effect obtained after incubation for 2 hours. Variations in the formation of buds caused by irradiation recur regularly.

4. A distinct dependence of the value and sign of the mitogenetic effect on the time of incubation was observed when the effect was determined during 2 hours at intervals of 15 minutes. The dependence was not observed when the effect was determined at intervals of one hour.

5. The value and the sign of the effect (positive or negative) vary according to the length of time of incubation. This dependence is pictured as sinusoid (Fig. 5).

6. Gurwitsch's hypothesis about the possibility of demonstrating the mitogenetic effect on the youngest buds has been confirmed.

7. As the budding of yeast cells irradiated through quartz differed from the budding of cells irradiated through glass, the conclusion may



be drawn that the cultures of those yeasts constituted a source of radiation active only through quartz. It should be added that those yeast cultures are also fairly susceptible to radiation, the effects obtained being the best proof. From this one may conclude that the yeast *S. cerevisiae* Hansen (strain of baker's yeast AS), may be used in investigations on mitogenetic radiation.

The first part of the document is a letter from the Secretary of the Board of Directors to the Board of Directors. The letter is dated 1911 and is addressed to the Board of Directors. The letter discusses the financial condition of the company and the proposed budget for the year 1911. The letter also discusses the proposed changes to the company's bylaws and the proposed changes to the company's charter. The letter is signed by the Secretary of the Board of Directors.

The second part of the document is a report from the Board of Directors to the Board of Directors. The report is dated 1911 and is addressed to the Board of Directors. The report discusses the financial condition of the company and the proposed budget for the year 1911. The report also discusses the proposed changes to the company's bylaws and the proposed changes to the company's charter. The report is signed by the Board of Directors.

The third part of the document is a resolution of the Board of Directors. The resolution is dated 1911 and is addressed to the Board of Directors. The resolution discusses the financial condition of the company and the proposed budget for the year 1911. The resolution also discusses the proposed changes to the company's bylaws and the proposed changes to the company's charter. The resolution is signed by the Board of Directors.

The fourth part of the document is a resolution of the Board of Directors. The resolution is dated 1911 and is addressed to the Board of Directors. The resolution discusses the financial condition of the company and the proposed budget for the year 1911. The resolution also discusses the proposed changes to the company's bylaws and the proposed changes to the company's charter. The resolution is signed by the Board of Directors.

The fifth part of the document is a resolution of the Board of Directors. The resolution is dated 1911 and is addressed to the Board of Directors. The resolution discusses the financial condition of the company and the proposed budget for the year 1911. The resolution also discusses the proposed changes to the company's bylaws and the proposed changes to the company's charter. The resolution is signed by the Board of Directors.

The sixth part of the document is a resolution of the Board of Directors. The resolution is dated 1911 and is addressed to the Board of Directors. The resolution discusses the financial condition of the company and the proposed budget for the year 1911. The resolution also discusses the proposed changes to the company's bylaws and the proposed changes to the company's charter. The resolution is signed by the Board of Directors.

The seventh part of the document is a resolution of the Board of Directors. The resolution is dated 1911 and is addressed to the Board of Directors. The resolution discusses the financial condition of the company and the proposed budget for the year 1911. The resolution also discusses the proposed changes to the company's bylaws and the proposed changes to the company's charter. The resolution is signed by the Board of Directors.