

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXVIII, 6

SECTIO D

1973

Zakład Botaniki Farmaceutycznej. Instytut Analizy i Technologii Farmaceutycznej,
Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr hab. Tadeusz Szynal

Kazimiera GRZYCKA

Synteza DNA w kiełkujących nasionach *Vicia faba* L.

Синтез DNA в прорастающих семенах *Vicia faba* L.

DNA Synthesis in Germinant *Vicia faba* L. Seeds

Synteza DNA w kiełkujących nasionach wiąże się ściśle z przechodzeniem komórek ze stanu spoczynkowego do metabolizmu oraz ze wznowieniem ich cyklu życiowego. Badania wykazały, że jądra merystemu zarodkowego w spoczynkowych, suchych nasionach znajdują się w okresie intermitotycznym. Z prac Bogdanowa i wsp. (1964) oraz Avanzi i wsp. (1963) wynika, że w suchych nasionach *Pisum* i *Triticum* występują wszystkie kategorie jąder intermitotycznych — G_1 , S i G_2 , natomiast w nasionach *Vicia faba* stwierdzono występowanie jąder fazy G_1 i G_2 (Brunori i wsp. 1966), przy czym jądra fazy G_1 stanowią we wszystkich wypadkach zdecydowaną większość.

Badanie kiełkujących nasion jęczmienia (Chang, 1963), grochu (Bogdanow i wsp., 1964) i bobu (Davidson, 1966) pozwoliły na oznaczenie czasu pojawiania się pierwszych podziałów komórkowych, a zastosowanie metody autoradiograficznej na określenie początku syntezy DNA.

W naszej pracy przeanalizowano zagadnienie pojawiania się mitoz oraz syntezy DNA w kiełkujących nasionach *Vicia faba* L. przy użyciu metody cytofotometrycznej.

MATERIAŁ I METODYKA

Suche nasiona *Vicia faba* L. moczone w wodzie wodociągowej przez 24 godziny. Następnie wybierano nasiona jednakowo nabrzmiałe i hodowano je dalej w płytkach Petriego na wilgotnej bibule w temperaturze 20°C. Obserwacji dokonano na korzeniach zarodkowych z nasion suchych oraz na korzeniach z nasion kiełkujących, w odstępach 6-godzinnych począwszy od chwili zakończenia 24-godzinnego moczenia. Szczytowe odcinki korzeni (1 mm) utrwalano w płynie Carnoya i sporządzano preparaty trwałe. Podłużne skrawki mikrotomowe, grubości 10 mikronów hydrolizowano w 1 n HCl przy temperaturze 60°C przez 8 minut i barwiono cdczyn-

nikiem Schiffa przez 2 godziny. Po 3-krotnym przepłukaniu w wodzie z SO_2 zamykano w balsamie. Zawartość DNA w badanym materiale oznaczano cytofotometrycznie przy użyciu fotometru Zeissa, typ II (Grzycka, 1967). Wyniki zestawiono w tabelach i histogramach.

BADANIA WŁASNE

Założeniem pracy było stwierdzenie, w jakim okresie czasu od wykiełkowania nasion pojawiają się pierwsze podziały mitotyczne, oraz kiedy rozpoczyna się synteza DNA. Punktem wyjściowym było zbadanie stanu komórek w nasionach spoczynkowych.

W tab. 1 przedstawiono dane liczbowe uzyskane na podstawie cytofotometrycznego oznaczania DNA w jądrach merystemu korzeniowego nasion suchych oraz nasion kiełkujących. Zestawione wyniki pozwalają stwierdzić, że jądra komórek merystematycznych nasion suchych znajdują się we wszystkich stadiach intermitozy, to znaczy G_1 , S i G_2 . Jądra fazy G_1 są najliczniejsze, stanowią bowiem aż 79%, jądra G_2 — 14%, natomiast jądra fazy S zaledwie 7%. Podobnie kształtuje się sytuacja w nasionach moczonych przez 24 godziny, a także w merystemie korzeniowym nasion hodowanych przez 18 godzin od zakończenia moczenia, gdzie jądra fazy G_1 stanowią 76—80%, fazy S od 5 do 7% i fazy G_2 od 15—17%. Zawartość DNA w jądrach komórek merystematycznych omawianych korzeni nasion ilustruje ryc. 1, A, B i C. Nieznaczne różnice występują w korzeniach po 24 godzinach od zakończenia moczenia. Obserwuje się w nich niewielki spadek jąder fazy G_1 (64%) oraz wzrost liczby jąder fazy S i G_2 (13 i 23%) — ryc. 1 D.

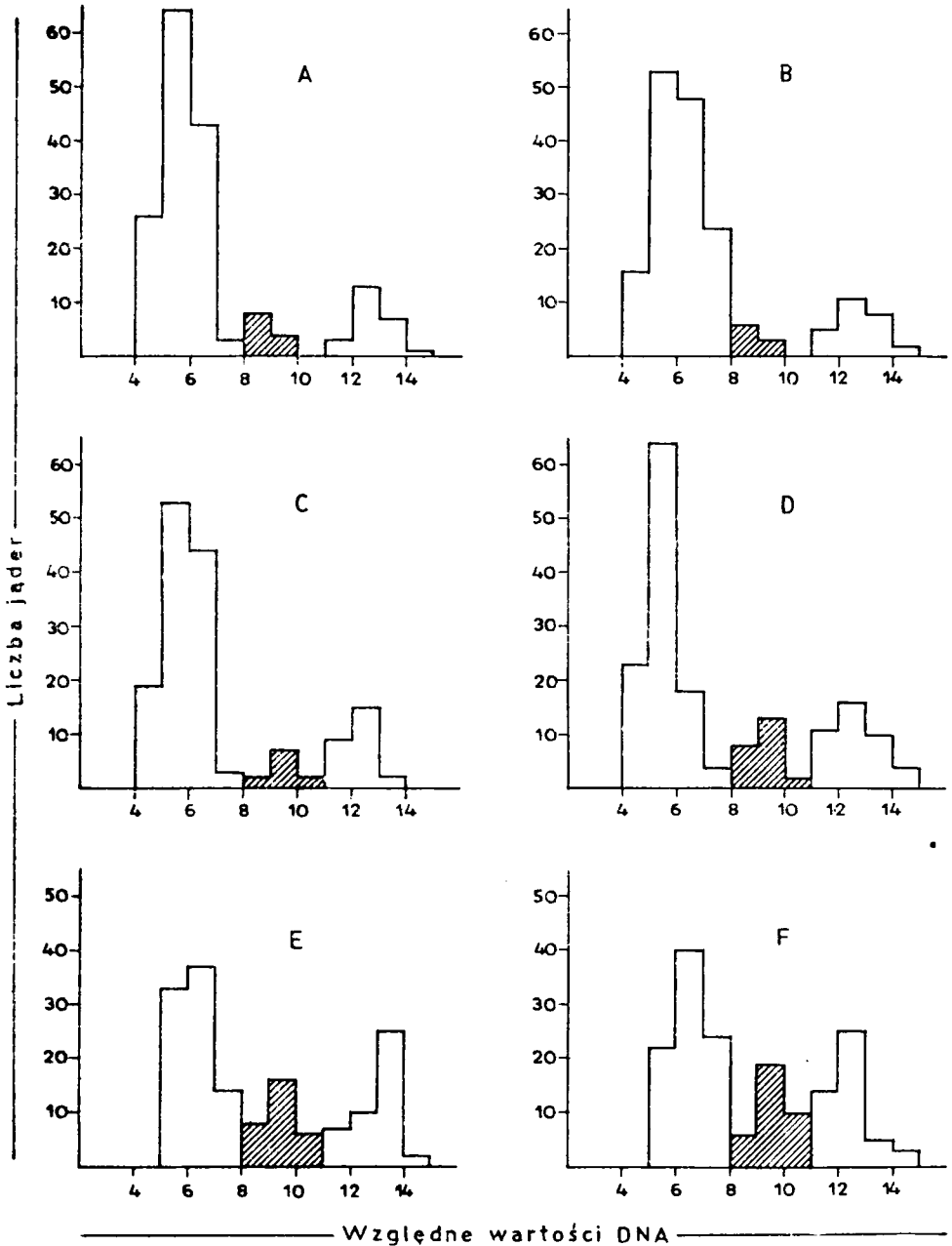
Wyraźna różnica występuje po 30 godzinach hodowli. Liczba jąder fazy G_1 spada do 54%, wzrasta natomiast liczba jąder fazy S do 19% i fazy G_2 do 27%. Na tym samym mniej więcej poziomie (51, 21 i 28%) utrzymuje się stan jąder w poszczególnych fazach po 36 godzinach od zakończenia moczenia (ryc. 1 E i F).

W preparatach z korzeni nasion pozostających w hodowli 18 godzin zauważono pojedyncze, nieliczne figury mitotyczne. W związku z tym przeanalizowano po 10 korzeni z nasion hodowanych na płytkach przez 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54 i 60 godzin. Z każdego z 10 korzeni obliczano w preparatach po około 1 000 komórek z uwzględnieniem komórek dzielących się. Wyniki liczbowe zestawiono w tab. 2.

W grupie 1 (18 godzin), gdzie nasiona były mocno napęczniałe i miały pękniętą łupinę, na 10 badanych korzeni tylko w 4 korzeniach stwierdzono obecność mitoz. W grupie 2 (24 godziny) w 6 korzeniach na 10 i w grupie 3 (30 godzin) w 7 korzeniach. Procent komórek dzielących się wynosił w tych grupach od 0,29 do 0,94. W pozostałych grupach mitozy obserwowano we wszystkich badanych korzeniach. W grupie 4 (36

Tab. 1. Zestawienie jąder o różnej zawartości DNA w merystemie korzeniowym suchych i kiełkujących nasion *Vicia faba* L.
 A list of nuclei of a various DNA content in root meristem of dry and germinant *Vicia faba* L. seeds

Korzenie	Liczba korzeni	Ogólna liczba jąder	G ₁		S		G ₂	
			liczba	%	liczba	%	liczba	%
Nasion suchych	5	860	680	79	58	7	122	14
Nasion moczonych 24 godz.	5	980	702	80	46	5	132	15
Nasion w 18 godz. po zakończeniu moczenia	5	780	596	76	54	7	130	17
Nasion w 24 godz. po zakończeniu moczenia	5	860	546	64	114	13	200	23
Nasion w 30 godz. po zakończeniu moczenia	5	780	420	54	147	19	213	27
Nasion w 36 godz. po zakończeniu moczenia	5	840	432	51	175	21	233	28



Ryc. 1. Histogramy zawartości DNA w jądrach komórek merystemu korzeniowego suchych i kielkujących nasion *Vicia faba* L. A — nasion suchych, B — nasion moczonych przez 24 godziny w wodzie, C — nasion po 18 godz., D — po 24 godz., E — po 30 godz. oraz F — po 36 godz. od zakończenia moczenia

Tab. 2. Częstotliwość mitoz w merystemie korzeniowym *Vicia faba* L.
The frequency of mitosis in *Vicia faba* L. root meristem

Czas w godz. od zakończenia moczenia	Liczba korzeni badanych	Liczba korzeni z mitozami	Całkowita liczba komórek	Komórek dzielących się	
				liczba	%
18	10	4	8705	25	0,29
24	10	6	9240	72	0,78
30	10	7	9407	88	0,94
36	10	10	8920	406	4,55
42	10	10	9730	1050	10,79
48	10	10	8640	1065	12,33
54	10	10	10050	2140	21,29
60	10	10	9850	2230	22,64

godzin) korzenie były lekko wysunięte, a w grupach 5 do 8 (42—60 godzin) osiągały długość 5—15 mm. Częstotliwość podziałów była tu różna, zarówno w poszczególnych korzeniach w obrębie jednej grupy, jak też i w obrębie badanych grup. Procent komórek dzielących się w korzeniach nasion hodowanych przez 36 godzin od zakończenia moczenia wynosił 4,55, po 42 i 48 godzinach wzrósł do 10,79 i 12,33, a po upływie 54 i 60 godzin równał się 21,29 i 22,64% (tab. 2).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wyniki uzyskane w naszych badaniach na podstawie oznaczania zawartości DNA, a także dane z piśmiennictwa (Bogdanow i wsp. 1964, 1967, Avanzi i wsp. 1963, Brunori i wsp. 1966) pozwalają na stwierdzenie, że stan komórek w merystemie zarodkowym nasion suchych badanych roślin kształtuje się podobnie. Jądra fazy G_1 stanowią większość, niezależnie od występujących wahań liczbowych, jak np. w przypadku nasion grochu z różnych lat o wyraźnie innych warunkach klimatycznych (Bogdanow i wsp. 1967). Jedyne zagadnienie dotyczące występowania komórek w fazie S, to znaczy komórek z nie zakończoną syntezą DNA, pozostaje otwarte. W badaniach suchych nasion *Vicia faba* (Brunori i wsp. 1966) wykazano jedynie obecność jąder fazy G_1 i G_2 , podczas gdy w naszych obserwacjach stwierdzono również

Histograms of the DNA content in cell nuclei of root meristem of dry and germinant *Vicia faba* L. A — dry seeds, B — seeds soaked for 24 hours in water, C — seeds after 18 hours, D — after 24 hours, E — after 30 hours, F — after 36 hours.

From the end of soaking

występowanie jąder fazy G_1 i G_2 , ale zauważono ponadto jądra posiadające pośrednie wartości DNA. Stanowią one zaledwie 7%.

Utrzymywanie się podobnego, jak w nasionach suchych, stanu komórek w merystemie korzeniowym nasion moczonych przez 24 godziny, a także w pierwszych grupach nasion hodowanych potwierdza wnioski Bogdanowa i wsp. (1964), którzy stwierdzają, że jest to okres zwiększania się rozmiarów komórek i jąder na skutek nawadniania, brak jest jednak w tym okresie syntezy DNA.

Nieznaczny wzrost liczby jąder fazy S i G_2 oraz spadek liczby jąder fazy G_1 po 24 godzinach od zakończenia moczenia, pozwala sądzić, że w tym okresie pewna liczba jąder rozpoczyna syntetyzowanie DNA, tym bardziej, że w grupach następnych (30 i 36 godzin) obserwuje się dalszy wzrost liczby jąder fazy S i G_2 . Jak wynika z obserwacji, w przeważającej liczbie korzeni *Vicia faba*, synteza DNA wyprzedza mitozę. Początek syntezy DNA występuje bowiem po 24 do 30 godzinach od zakończenia moczenia nasion, a podziały mitotyczne występują we wszystkich korzeniach dopiero po 36 godzinach. Jednakże w niektórych korzeniach pierwsze mitozy pojawiają się już po 18 godzinach, a więc w czasie, w którym nie stwierdzono syntezy DNA. Davidson (1966) sugeruje, że są to komórki, które w okresie spoczynkowym nasienia pozostawały w fazie G_2 , a więc były już przed wykiełkowaniem nasion przygotowane do rozpoczęcia podziałów.

PIŚMIENNICTWO

1. Avanzi S., Brunori A., D'Amato F., Ronchi V. N., Mugnozsa G. T. S.: Caryologia. 16, 533—558, 1963.
2. Bogdanow J. F., Jordanskij A. B.: Žurn. obszcz. bioł. 25, 357—363, 1964.
3. Bogdanow J. F., Liapunowa N. A., Szerudiło A. I.: Cytologija. 9, 569—576, 1967.
4. Brunori A., Avanzi S., D'Amato F.: Mutation Res. 3, 305—313, 1966.
5. Chang C. W.: Nature 198, 1167—1169, 1963.
6. Davidson D.: Amer. J. Bot. 53, 491—495, 1966.
7. Grzycka K.: Acta Soc. Bot. Pol. 36, 657—669, 1967.

Otrzymano 10 IV 1973.

РЕЗЮМЕ

Целью работы было выяснение, в какое время после прорастания семян *Vicia faba* L. начинается митотическое деление и синтез DNA. Содержание DNA в ядре меристематических клеток сухих и прорастающих семян определялось цитофотометрически. В результате проведенных исследований установлено, что в меристеме сухих семян встречаются все

категории интермитотических ядер, т. е. G_1S и G_2Y . У большинства исследованных корней синтез DNA в прорастающих семенах опережает митотическое деление. Синтез начинается спустя 24—30 часов, тогда как митоз — спустя 36 часов культуры.

S U M M A R Y

The foundation of the work was to ascertain in which period of time from the germination of *Vicia faba* L. seeds does the mitotic and DNA synthesis division begin. The DNA contents in the meristemal cell nuclei of dry and germinant seeds was determined cytophotometrically. In result of the carried out observations it was ascertained that, in dry seed meristem, all the categories of intermitotic nuclei appear, that is G_1 , S and G_2 . DNA synthesis in germinant seeds, in the majority of studied roots, precedes the mitotic division. It begins after 24—30 hours, while mitoses occurs in all the studied roots only after 36 hours of culture.

