

Vol. XII. Nr. 2.



1935.

Acta Societatis Botanicorum Poloniae

Organ Polskiego Towarzystwa Botanicznego
Publication de la Société Botanique de Pologne

Komitet Redakcyjny — Comité de Rédaction:

*B. Hryniewiecki (Warszawa), S. Krzemieniewski
(Lwów), B. Niklewski (Poznań), W. Szafer (Kraków),
P. Wiśniewski (Wilno), Z. Wóycicki (Warszawa).*

Redaktor — Rédacteur: *K. Bassalik (Warszawa)*



WYDANO Z ZASIŁKIEM
MINISTERSTWA W.R. i O.P. i FUNDUSZU KULTURY NARODOWEJ
WARSZAWA

Treść — Sommaire:

	Str. Page
EWA WIŚNIEWSKA: Badania cytologiczne nad <i>Oenothera Hookeri</i> de Vries. (Zytologische Untersuchungen an <i>Oenothera Hookeri</i> de Vries)	113
G. FLANCERÓWNA: Badania nad naturą amylazy słodowej. (Untersuchungen über die Natur der Malzamylase).	165
TADEUSZ DOMINIK: Grzyby pasorzytnicze zebrane w okolicy Włocławka w sierpniu 1934 roku. (Champignons parasitiques aux environs de Włocławek)	201

EWA WIŚNIEWSKA.

BADANIA CYTOLOGICZNE NAD *OENOTHERA* *HOOKERI* DE VRIES.

(Zytologische Untersuchungen an *Oenothera*
Hookeri de Vries).

(Wpłynęło 19. VI. 1935)

W S T Ę P.

Rodzaj *Oenothera* już od kilkudziesięciu lat stanowi przedmiot żywych zainteresowań, dla których punktem wyjścia była teoria mutacyj de Vriesa, oparta i rozbudowana głównie na badaniach nad *Oenothera*mi. Dzięki ogólnemu znaczeniu teorii de Vriesa badania te podjęło wielu uczonych, opracowując zjawiska zmienności i dziedziczenia, bardziej zawiłe niż u innych form i odbiegające od ogólnego schematu. (Bartlett, Boedijn, Cobb, Davis, Dulfer, Gates, Heribert-Nilsson, Klebahn, Lotsy, Lutz, Oehlkers, van Overeem, Renner, Schwemmle, Shull, Stomps, Vail i in.).

Z drugiej zaś strony *Oenothera* obudziła zainteresowanie cytologów, z początku zupełnie niezależnie od przeprowadzonych nad nią badań genetycznych i systematycznych. Po pierwsze, w okresie sporu między zwolennikami teorii para i metasyndezy, wyznawcy tej ostatniej wysuwali jako klasyczny obiekt liczne gatunki *Oenothera*, u których w diakinezie występują chromozomy połączone końcami (Gates, 1908 i nast.), a po drugie właśnie to zjawisko występowania pierścieni chromozomów w diakinezie znane przez długi czas tylko u *Oenothera*, zastanawiało cytologów i domagało się wyjaśnienia.

Punkt zwrotny w badaniach nad *Oenothera* stanowią badania genetyczne Rennera i cytologiczne Clelanda. Teoria

kompleksów Rennera (1925), wyjaśniająca zgodnie z podstawami mendlowskiego dziedziczenia występowanie w mieszańcach większej niż normalnie ilości typów i powiązanie jej z obserwacjami Clelanda (1922: zygzakowate ułożenie chromozonów, wchodzących w skład pierścieni, w metafazie heterotypowej), które również tłumaczą tworzenie wielu nowych form i mutacji, głównie naskutek non-dyzjunkcji — oto wyniki, które wyjaśniły zasadnicze zjawiska zmienności i dziedziczenia u *Oenothera*, zyskując dla nich podstawę cytologiczną i w innym świetle stawiając teorię de Vriesa.

Badania cytologiczne, które dzięki wykryciu pierścieni chromozomów i mechanizmu rozchodzenia się ich, pozwoliły na zrozumienie zjawisk dziedziczenia u *Oenothera*, szły dalej w dwóch kierunkach:

1) w dalszym ciągu prowadzono badania nad przebiegiem podziału redukcyjnego celem ostatecznego rozstrzygnięcia pytania: para- czy telosyndeza? — i dla wyjaśnienia, w jaki sposób powstają pierścienie; to ostatnie zagadnienie ma szczególne znaczenie w związku z mechanizmem dziedziczenia;

2) starano się zanalizować garnitur chromozomów, aby zyskać dla badań genetycznych podstawę cytomorfologiczną. Badania te nie dały dotychczas pożądaných wyników. Prześledzeniu konjugacji chromozomów staje na przeszkodzie wielka wrażliwość jąder na działanie utrwalacza, dzięki czemu w profazie heterotypowej następuje bardzo silny skurecz, uniemożliwiający dokładną obserwację od wczesnej profazy aż do późnego diplotenu. Nieliczne zaś próby, podjęte dla zanalizowania garnituru chromozomów, dały dotychczas wyniki negatywne naskutek następujących okoliczności: chromozomy są małe i nie różnią się poważnie wielkością; punkty zaczepienia są naogół środkowe, tak, że nie można różnicować chromozomów na podstawie stosunku długości ramion; nie stwierdzono też dotychczas satelitów (z wyjątkiem jednej wzmianki w pracy Catcheside'a, 1933 r.).

Pomimo negatywnego wyniku badań nad garniturem chromozomów, badań, które stanowią podstawę współczesnych prac cytogenetycznych, pomimo niewystarczających danych obserwacyjnych z podziału redukcyjnego u *Oenothera*, rezultaty, osiągnięte w latach ostatnich, opierają się jednak na podstawie cytologicznej; jest nią hipoteza wymiany między niehomologami, wysunięta poraz pierwszy przez Bellinga (1927), według której

wymiany te prowadzą do wytworzenia pierścieni w podziale redukcyjnym i związanego z tem specjalnego sposobu dziedziczenia.

Hipoteza ta, dziś ogólnie przyjęta, znalazła szerokie zastosowanie nie tylko w pracach nad *Oenothera*, lecz także w badaniach, przeprowadzonych nad innymi rodzajami, np. *Zea*, *Datura* i *Pisum*. Na jej podstawie Cleland i Blakeslee (1930), Emerson i Sturtevant (1931) i in. mogli przewidzieć diakinezowe konfiguracje chromozomów w wielu mieszańcach i zlokalizować niektóre geny w określonych chromozomach, przy czem osiągnięte wyniki zgodne były z wynikami Rennera, otrzymanymi na drodze czysto genetycznej. Hipoteza Bellinga, przyjmująca parasyndezę w końcach chromozomów, wchodzących w skład pierścieni, tłumaczy również możliwości crossing-over, który niejednokrotnie był stwierdzony u *Oenothera*. Słuszność tej hipotezy potwierdziły wreszcie bezpośrednio obserwacje moje nad *Oenothera Hookeri. velutina vetaurea* (1932), Kollera nad *Tradescantia* (1932) i Smitha nad *Brodiaea lactea* (1933).

Zadaniem niniejszej pracy było zbadanie przebiegu podziału redukcyjnego i analiza garnituru chromozomów u *Oenothera Hookeri*, celem wyjaśnienia następujących pytań: 1) czy — pomimo negatywnego wyniku dotychczasowych badań — istnieje podstawa do szcharakteryzowania poszczególnych chromozomów, bądź w podziale redukcyjnym, bądź w somatycznym, która umożliwiłaby zlokalizowanie genów w morfologicznie określonych chromozomach, oraz pozwoliła na bezpośrednie rozwiązanie pewnych zagadnień genetycznych? 2) jaki jest sposób konjugacji w gatunku, tworzącym „normalne” biwalenty; czy przebieg profazy heterotypowej odpowiada w ogólnych zarysach temu, co wiemy o innych „normalnych” formach? 3) jaka może być przyczyna strukturalna, dla której u *Oenothera* wymiany między niehomologami są zjawiskiem bardzo częstym, podczas, gdy u większości rodzajów nie zdarzają się wcale, lub rzadko i sporadycznie?

Jako obiekt badań wybrałam *Oenothera Hookeri*, wychodząc z założenia, że najpierw należy zbadać gatunek najprostszy, zachowujący się normalnie zarówno pod względem cytologicznym, jak genetycznym; jest to forma homozygotyczna, oddawna znana w hodowli jako stała: w przeciwieństwie do większości *Oenother* nie rozszczepia się ani nie tworzy w warunkach naturalnych mutacyj. W podziale redukcyjnym nie tworzą się pierścienie chromozomów, ale siedem biwalentów.

WYNIKI DOTYCHCZASOWYCH BADAŃ NAD GARNITUREM CHROMOZOMÓW I NAD MEIOZĄ U *OENOTHERA*.

1. Badania nad garniturem chromozomów.

Próby zanalizowania garnitura chromozomów u *Oenothera* przeprowadzano na płytkach metafazowych w stożkach wzrostu korzeni.

Geerts (1907) stwierdza różnicę w wielkości chromozomów u *Oe. Lamarckiana*, lecz są one tak małe, że niedostatecznie dokładne metody pomiarów nie pozwalają na wyciąganie pewnych wniosków. Wg. Gatesa natomiast, który badał cytologię licznych form, pochodzących od *Oenothera Lamarckiana*, niema uchwytnych różnic ani w wielkości, ani w kształcie chromozomów. Brak ich stwierdza również Lutz (1916): obok całkowitych, nieróżniących się między sobą chromozomów, występują wg. tej autorki w niektórych mutacjach fragmenty chromozomów. Fragmentację chromozomów opisuje również Hance (1918), przypisując jej zaobserwowane przez niego różnice w długości chromozomów w trisomatycznej formie *scintillans* (1:1,8) — jednak zarówno jego pomiary jak i rozumowanie nie wytrzymują krytyki. Van Overeem (1922) wyróżnia cztery typy par chromozomów u *Oe. Lamarckiana*, opierając się na ich „kształcie”, a mianowicie na stopniu wygięcia chromozomów w płycie metafazowej — jednak kryterjum to nie jest wystarczające.

Pomimo negatywnego wyniku przytoczonych prac, pomimo podkreślanej przez wielu autorów niemożności wyróżnienia poszczególnych chromozomów na podstawie ich wielkości i „kształtu”, próbę analizy płytek somatycznych podjęli w ostatnich latach Lewitsky i Darlington. Lewitsky (1931) doszedł do następujących wyników: w badaniach nad *Oe. Lamarckiana*: stosunek długości najkrótszego do najdłuższego chromozomu wynosi 1:1,35. Jedną parę chromozomów charakteryzuje „a rather big appendage separated by an achromatic zone”. Wśród pozostałych chromozomów wyróżnia autor trzy grupy: 1) trzy pary o punkcie przewężenia mniej więcej środkowym; 2) jedna para o ramionach różnej długości i 3) jedna para także różnoramienna, lecz mniejsza od poprzedniej. Na jednym z jego rysunków (21 c) widać chromozom satelitowy, lecz autor nie zwraca na to uwagi. Darlington (1931) podaje najdokładniejsze z dotychczasowych rysunki płytek dla kilku heterozygotycznych gatunków

i mieszańców i, stwierdzając bardzo zawiłą budowę chromozomów (satelity, punkty przewężenia pierwotne i wtórne), pisze, że chromozomy nie dadzą się ułożyć w pary w diploidach ani w grupy po trzy w triploidach. Najdłuższe chromozomy, w każdej z form badanych przez niego, są dwa razy większe od najkrótszych.

Jeśli chodzi o chromozomy w podziale redukcyjnym, to mamy jedną tylko wzmiankę Sch w e m m l e g o (1927), wg. którego w krzyżówce *Oe. Berteriana* $\times$ *muricata* można odróżnić chromozomy obydwu gatunków rodzicielskich na podstawie ich wielkości. Dany tym przeczy jednak Darlington (1931), twierdząc, że ten sposób rozróżniania niemożliwy jest w żadnym ze znanych mieszańców.

Nie obserwowano również satelitów w meiozie z wyjątkiem Catcheside'a, który opisał, jak już wyżej zaznaczyłam, występowanie chromozomu satelitowego u haploidalnej *Oenothera blandina* (1933 a).

2. Badania nad meiozą.

Struktura jądra spoczynkowego komórek macierzystych nie jest dokładnie zbadana. Większość autorów charakteryzuje ją w następujący sposób: pod błoną jądra rozmieszczone są chromocentry; ilość ich nie jest stała, ale waha się około 14, t. zn. diploidalnej liczby chromozomów. Oprócz chromocentrów znajduje się w jądrze delikatna sieć bardzo cienkich i słabo barwiących się nici. Oprócz jednego dużego jąderka występuje czasem jedno lub kilka mniejszych (Davis, 1909, 1910, 1911; Cleland, 1924—1929; H å k a n s s o n, 1928; Illick, 1929; Weier, 1929; Gates i Goodwin, 1931; Leliveld, 1931; Anderson, 1933). Davis (1909), Illick (1929) i Leliveld (1931) uważają chromocentry za prochromozomy.

Wg. Sheffield (1927) i H å k a n s s o n a (1928) jądra spoczynkowe zawierają początkowo tylko sieć, w której potem zaczynają kondensować się silnie barwiące się bryłki. Cleland (1926), Gates i Sheffield (1929), Kul Karni (1929) i Hedayetullah (1933) nie widzą wogóle żadnych chromocentrów a tylko reticulum.

Prześledzenie profazy redukcyjnej — od bardzo wczesnych stadiów aż do diakinezy — bardzo utrudnia silny skurecz, występujący zarówno na parafinowych, jak i na smarowanych preparatach przy zastosowaniu bardzo różnorodnych

utrwalaczy. Dlatego też profaza u *Oenothera* zbadana jest o wiele mniej dokładnie, niż u innych rodzajów, mimo licznych w tym kierunku usiłowań.

W badaniach nad profazą większość autorów, zwłaszcza zpośród dawniejszych cytologów, dochodzi do wyników w ogólnych zarysach zgodnych. Wyniki te dadzą się streścić w następujący sposób: sieć jądra spoczynkowego zaczyna się silniej barwić i staje się bardziej nieregularna poczem wyróżnicowuje się z niej splot nici, które nigdy nie leżą równolegle do siebie. Na skutek silnego skurczu nici te tworzą zbity kłębek, w którym nie można prześledzić ich przebiegu. Kłębek zaczyna się stopniowo rozluźniać, w rezultacie czego przechodzimy do stadium „open spirem”: nici (= chromozomy), znacznie grubsze niż poprzednio, rozmieszczone są w całym terytorjum jądra. I w tym stadium nie leżą one nigdy równolegle parami, ani nie są rozszczepione. Po stadium „open spirem” następuje drugi skurcz i wreszcie z kłębka „wynurza się” chromozomy tak jak dotychczas połączone ze sobą końcami. Zarówno biwalenty jak pierścienie powstają przez poprzeczną segmentację spiremy ciągłej (Gates, 1908; Geerts, 1909; Davis, 1909; Gates and Thomas, 1914; Schwemmler, 1924; Cleland, 1922—1929; Valcanover, 1926; Sinoto, 1927; Sheffield, 1927 i 1929; Håkansson, 1928; Illick, 1929; Kulkarni, 1929; Gates and Sheffield, 1929; Capinpin, 1930). A zatem wszyscy ci autorzy stwierdzają jednogłośnie występowanie u *Oenothera* telosyndezy, nie mogąc jednak prześledzić dokładnie rozwoju chromozomów.

Charakterystyczną jest rzeczą, że w wielu pracach przytoczonych powyżej widać na rysunkach równoległe układanie się chromozomów na ich odcinkach wystających z kłębka (zygoten). autorzy tych prac jednak, nie mogąc prześledzić konjugacji dokładniej, nie zwracają na to uwagi, lub interpretują fakt ten jako przypadek (Gates, 1908; Davis, 1910 i 1911; Cleland, 1924, 1926 a i b; Sheffield, 1927; Kulkarni, 1929) lub jako rozszczepienie uniwalentów (Geerts, 1911).

Pomiędzy cytowanymi powyżej autorami, którzy zgodnie przedstawiają ogólny przebieg profazy redukcyjnej, są jednak różnice w obserwacjach, dotyczących poszczególnych stadiów.

Davis (1909, 1910) opisuje — niedokładnie zresztą — przemianę chromocentrow we wczesnej profazie: przed synapsis jądro wypełnia się gęstą siecią; w miarę jej tworzenia chromo-

centry tracą swój kulisty kształt i wkońcu „become lost in the deeply staining strands of this dense network”.

Wg. Clel and a (1922—1929) sieć jądra spoczynkowego przekształca się w splot nici, które stają się coraz to bardziej nie-regularne. Niektóre z nich zaczynają się skracać, grubieć i barwić silniej, wskutek tego, że ze skupień chromatyny — jak nazywa on chromocentry — spływa do nici barwiąca się substancja chromatynowa. Clel and stwierdza stały kontakt chromozomów z jądrem i, opierając się na coraz to słabszym barwieniu się jąderka w miarę postępowania profazy i na jednoczesnym coraz to silniejszym zabarwieniu chromozomów, dochodzi do wniosku, że substancja jąderkowa spływa do chromozomów. Wewnątrz jąderka — zdaniem Clel and a — występuje czasem w profazie ciemno barwiące się ciało, t. zw. *endonucleolus*. Spirema przez cały czas profazy jest pojedyncze.

Sch w e m m l e (1924) opisuje „typową” profazę dla *Oenothera Hookeri*. Ciągła spirema ulega segmentacji poprzecznej, dzięki której odcina się siedem biwalentów, w których uniwalenty połączone są jednym końcem. Biwalenty w kształcie pierścieni, charakterystyczne dla *Oe. Hookeri*, powstają przez wtórne połączenie wolnych końców uniwalentów.

Wg. V a l c a n o v e r a (1926) spirema, z której powstają pierścienie u *Oe. biennis*, nie jest jednolitej grubości — połączenia między chromozomami są cieńsze; w pracy tej mamy pierwszą wzmiankę o nierównej kondensacji chromozomów. Autor podkreśla jednak, że nie udało mu się zbadać znaczenia tych połączeń.

Sheffield (1927), podając opis meiozy zgodny zasadniczo z wyżej podanym, w następujący sposób opisuje wczesną profazę: delikatna sieć jądra spoczynkowego przekształca się w splot nici. „The threads now comprise relatively dark-staining thread” — „Eventually the reticulum becomes completely resolved into a single, long fine, apparently continuous thread”. Następne prace Sheffield (1929) oraz Gates a i Sheffield (1929) potwierdzają te wyniki.

H å k a n s s o n (1926) obserwuje u *Oe. Lamarckiana* rozszczepienie pachynemy, uważa je jednak za rozszczepienie somatyczne uniwalentnej spiremy. To, że części nici leżące bliżej jąderka są grubsze, nie dowodzi wg. niego spływania substancji jąderkowej do chromozomów, jak twierdzi Clel and, lecz polega na tem, „dass sie durch Einwirkung des Fixiermittels zusammen-

geschmolzen sind". W pracy z 1929 r. opisuje Håkansson wczesną profazę, podobnie, jak Sheffield: w niciach, stanowiących „Kerngerüst”, pojawiają się skupienia chromatyny. Na jednym z rysunków w tej pracy (Fig. 1c) widać bardzo wyraźnie układanie się chromocentrów parami, ale autor nie zwraca na to uwagi.

Teorja telosyndezy, przyjęta przez tylu autorów na podstawie bezpośrednich obserwacji, przez długi czas nie miała zdecydowanych przeciwników z wyjątkiem Boedijna i Kihary. Boedijn (1924) opisuje parasynapsis u *Oe. Lamarckiana*, u której wg. niego tworzy się siedem biwalentów, a powstawanie pierścieni jest tylko wynikiem przypadkowego zlepiania chromosomów. Opis ten nie jest jednak zgodny z istotnym stanem rzeczy. Ichni bowiem cytologowie, którzy badają *Oe. Lamarckiana*, stwierdzają zgodnie występowanie w diakinezie pierścienia z 12 chromosomów i jednego biwalentu. To samo potwierdzają również moje obserwacje nad tym gatunkiem.

Kihara (1927) nie obserwuje wprawdzie parakonjugacji u badanej przez niego *Oe. biennis*, lecz dowodzi jej na podstawie analogji z tworzeniem pierścieni u *Rumex acetosella*, u którego przebieg konjugacji chromosomów, tworzących pierścien z sześciu uniwalentów, zarówno w zygotenie, jak w diplotenie jasno dowodzi parasyndezy. Obecne dane wskazują jednak na to, że *Rumex acetosella* jest formą polyploidalną i tworzenie pierścieni—polywalentów ma inną podstawę niż w heterozygotycznych gatunkach typu *Oenothera*.

Próby interpretacji parasyndetycznej znajdujemy pozatem u Stompsa (1910) i u Lewitskiego (1927) — obaj ci autorzy wysnuwają wnioski także nie na podstawie obserwacji, lecz przez analogję z badaniami przez nich obiektami (Stomps nad *Spinacia oleracea*, Lewitski nad *Beta vulgaris*).

Parasyndezę stwierdza również Weier (1929) u homozygotycznej *Oe. Hookeri*. Opisuje on stadja lepto-, zygo- i diplotenu. Rysunki jego wskazują na parasyndezę, lecz są bardzo niedokładne. U *Oe. Lamarckiana* natomiast niema wg. Weiera ani parasyndezy, ani też opisywanej przez innych autorów ciągłej spiramy, wskazującej na telokonjugację: 12 chromosomów tworzących pierścien w diakinezie nie konjugują wcale (asynapsis) i w pachytenie leżą oddzielnie, a dwa chromosomy tworzące biwalent konjugują bokami.

Punkt zwrotny w badaniach cytogenetycznych nad *Oenothera* stanowi hipoteza wymiany pomiędzy niehomologami. Hipoteza ta, wysunięta przez Bellinga (1927), zastosowana po raz pierwszy do *Oenothera* przez Håkanssona (1928), a następnie rozwinięta przez Darlingtona (1929 a 1931) i innych, okazała się nadzwyczaj płodna. Zgodnie z nią chromozomy w formach tworzących pierścienie konjugują bokami, przy czym parakonjugacja ma miejsce we wczesnej profazie i nie stoi wcale w sprzeczności z ułożeniem chromozomów końcami w diakinezie, jak to wyjaśnia załączony poniżej schemat:



Hipoteza wymiany między niehomologami pozwoliła na osiągnięcie poważnych wyników w badaniach cytogenetycznych i jest dziś powszechnie przyjęta — a co zatem idzie wszyscy zgadzają się na to, że i u *Oenothera* istnieje parakonjugacja, pomimo tego, że dawniejsze obserwacje skłaniały wszystkich prawie cytologów do przyjęcia teorii telosyndezy.

Z tej samej przyczyny zaprzestano intensywnych obserwacji nad przebiegiem podziału redukcyjnego, a autorzy nielicznych prac, jakie pojawiły się po ugruntowaniu hipotezy Bellinga, podają naogół obrazy profazowe zgodne z parasyndezą, a mianowicie:

Catcheside (1931) opisuje parasyndezę u formy, tworzącej pierścień z sześciu chromozomów i cztery biwalenty. Najwcześniejsze, dokładniej opisane przez niego stadium, to późny diploten. Środkowe części chromozomów są silnie skondensowane, a na słabo skondensowanych końcach znajdują się małe ziarenka — chromomery. Maksymalna ilość chiazm w diplotenie wynosi trzy, a w diakinezie, wskutek terminalizacji, zostaje zredukowana do dwóch, przeważnie terminalnych, rzadko subterminalnych. Catcheside podaje rysunki chiazm nie tylko w biwalentach, lecz i w chromozomach, wchodzących w skład pierścieni.

Do odmiennych wyników dochodzi w swej pracy Leliveld (1931); a mianowicie opisuje ona parasyndezę w bardzo wczes-

nych stadiach profazy: przed pierwszym skurczem zaczynają konjugować ze sobą chromocentry. Konjugacja trwa jednak krótko i po skurczu następuje stadium „much resembling the ordinary pachynema, but composed of single threads”. Sposób konjugacji nie odpowiada więc ani typowemu schematowi para- ani telosyndezy, raczej jednak zbliża się do tej pierwszej. Na rysunkach Leiveld widać jednak w wielu miejscach parakonjugację w zygii diplotenie.

W 1932 r. udało mi się stwierdzić parakonjugację końców chromosomów, wchodzących w skład pierścieni, zgodnie z założeniami hipotezy Bellinga, w mieszańcu *Hookeri. velutina velutarea*.

Wreszcie Anderson (1933) stwierdza parakonjugację w kilku trisomatycznych mutacjach.

W ostatnich latach jeden tylko Hedayetullah (1933) opisuje u homozygotycznej *Oe. missouriensis* odmienny typ konjugacji, który nazywa *acrosyndesis*. Nici leptotenowe stanowią według tego autora biwalenty, w których chromosomy połączone są tylko jednym końcem. Diplotenowe obrazy, typowe dla parakonjugacji, powstają przez tworzenie pętli i okracanie się uniwalentów dokoła siebie.

Jak widać z powyższego zestawienia, dotychczas nie udało się zbadać dokładnie profazy u *Oenothera*: historia przemian chromosomów i rozwoju pierścieni nie została wyjaśniona na drodze badań czysto morfologicznych. Jest rzeczą bardzo charakterystyczną, że opisy profazy zarówno u form diploidalnych, tworzących pierścienie, jak trisomatycznych i polyploidalnych, nie różnią się naogół od odpowiadających im opisów u homozygot, tworzących biwalenty.

Różnice te notują prawie wszyscy dopiero od diakinezy. Konfiguracja chromosomów w diakinezie jest dla wszystkich form naogół stała, chociaż sporadycznie mogą występować jądra o odmiennym układzie chromosomów. Najczęstszą zmianą jest zerwanie pierścienia, z którego w ten sposób powstaje łańcuch. Pierścienie zaobserwował poraz pierwszy Gates (1908) u *Oe. rubrinervis*. Od tego czasu poznano konfigurację chromosomów u kilkuset gatunków i mieszańców oraz u diploidalnych, triploidalnych i trisomatycznych mutacji. Biwalenty posiadają z reguły kształt pierścieni, gdyż uniwalenty połączone są tylko końcami. Dla diakinezy u *Oenothera* charakterystyczne jest częste przecięcie biwalentów (interlocking), opisywane lub rysowane przez

wielu autorów (Håkansson, 1928, 1930 a i b; Rudloff, 1929; Hoepfener i Renner, 1929; Catcheside, 1931; Darlington, 1931; Cleland i Oehlkers 1931; Gates i Goodwin, 1931; Leliveld, 1932; Hedayettullah, 1933 i in.). Przeplecenie biwaleńców występuje zarówno u hetero- jak i u homozygotycznych form. Gates i Goodwin (1931) zwrócili uwagę na częstość przeplecenia w dwóch homozygotach: u *Oe. blandina* występuje ono w 74% jąder, a u *Oe. purpurata* zaledwie w 43%; niestety jednak niewiadomo, czego dowodzi ta różnica. Zjawiskiem przeplecenia zajmuje się nieco dokładniej Catcheside (1931). Przeplecenie powstaje wg. niego dlatego, że chromozomy, rozrzucone na terenie całego jądra, zaczynają konjugować ze sobą końcami. Częstość przeplecenia (w 50% jąder) wskazuje na to, że jest to zjawisko przypadkowe. Catcheside zwraca również uwagę na nierówną kondensację chromozomów. Połączenia między uniwalentami uważa za chiazmy końcowe, i twierdzi, że są one podwójne. Czasem, wskutek niezupełnej terminalizacji, występują chiazmy subterminalne. O ile odcinek między subterminalną chiazmą a końcem chromozomu jest bardzo mały, to chiazma wygląda jak ziarenko na połączeniu między chromozomami. Autor interpretuje w ten sposób także obrazy Sheffield (1927), która opisuje ciemno barwiące się ziarenka między dwoma uniwalentami.

Opisy dalszych stadiów od prometafazy do interkinezy — można streścić w następujący sposób: w końcu diakinezy zanika błona jądrowa i jąderko oraz wytwarza się wielobiegunowe wrzeciono. Chromozomy układają się stopniowo w płytkę metafazową, przyczem chromozomy tworzące pierścienie układają się zygzakowato — tak, że sąsiednie uniwalenty zdążają zawsze do przeciwnych biegunów. Tworzeniu zygzaku przeczy wprowadzie Emerson (1924), lecz setki obserwacji, jakimi dziś rozporządzamy, wykluczają wszelkie wątpliwości dotyczące tej kwestji. Ściśle mówiąc, niema u *Oenother* właściwej płytki chromozomowej: chromozomy układają się w dwóch grupach, z których każda pójdzie do innego bieguna. Tylko Valcanover (1926) opisuje płytkę metafazową sensu stricto u *Oe. biennis*. Sądząc jednak z rysunków, Valcanover rozporządzał źle utrwalonym materiałem, w którym chromozomy zlepione były pod wpływem utrwalacza. Wrzeciono w metafazie jest już dwubiegunowe. Anafaza trwa dość krótko. Przy rozchodzeniu się chromozomów, tworzących pierścienie, następuje często non-dyzjunkcja.

W mutacjach trisomatycznych i triploidalnych częste są nieregularności, prowadzące do wytworzenia jąder o bardzo różnej liczbie chromosomów. W telofazie uwidacznia się rozszepienie uniwalentów, które przyjmują kształt krzyży, charakterystycznych dla jąder interkinezowych (Cleland, 1922—1929; Gates, 1908 i nast.; Schwemmler, 1924—1928; Valcanover, 1926; Håkansson, 1926—1930; Sheffield, 1927; Sino-tó, 1927; Weier, 1929; Kulkarni, 1929; Leliveld, 1931; Oelkrug, 1934).

Wg. Gates'a i Goodwin (1931) oraz Hedaya i Tullaha (1933) przeplecenie biwalentów przerywa się przed metafazą — przynajmniej w niektórych przeplecionych parach — a wg. Catcheside'a (1933 a i b) i Darlingtona (1931) trwa aż do metafazy włącznie. Ci dwaj ostatni autorzy opisują w metafazie występowanie chiazm interstitialnych (bardzo rzadko).

Cleland (1924, 1926 i 1929) oraz Gates i Sheffield (1929) podają dane, dotyczące tworzenia jąderok w telofazie heterotypowej: powstają one „de novo”, zawsze w kontakcie z chromosomami, często po kilka w jednym jądrze, jako małe, kuliste, słabo się barwiące utwory.

Dane, dotyczące *Oe. Hookeri*, znajdujemy tylko w trzech pracach spośród wszystkich cytowanych powyżej. Schwemmler (1924) opisuje typową profazę telosyndetyczną i tworzenie siedmiu biwalentów-pięścieni w diakinezie; Hoepfner i Renner (1929) stwierdzają również tworzenie siedmiu biwalentów w diakinezie; biwalenty posiadają wg. nich przeważnie kształt pięścieni, czasem jednak uniwalenty połączone są tylko jednym końcem (Fig. 22a); Weier wreszcie (1929) w badaniach nad profazą u *Oe. Hookeri* dochodzi do wniosku, że konjugacja przebiega wg. typu parasyndezy; praca jego nie jest jednak dokładna, autor myli się często w uszeregowaniu i interpretacji różnych stadiów.

BADANIA WŁASNE.

1. Materiał i metody.

Nasiona *Oenothera Hookeri* otrzymane od Profesora Clelanda „1931:57 derived originally from de Vries”.

Badania nad chromosomami somatycznymi przeprowadzaliśmy w komórkach meristematycznych stożków wzrostu korzeni, a nad po-

działem redukcyjnym w komórkach macierzystych pyłku. Przed utrwaleniem pyłników pendzlowałam je 70% alkoholem lub zanurzałam na 1–5 min. w płynie Carnoy o następującym składzie: 2 cz. alkoholu absolutnego i 1 cz. kwasu octowego lodowatego. Jako utrwalaaczy używałam następujących płynów: 1. utrwalače osmowe; a) Flemming mocny, b) Flemming słaby, c) Benda z dodatkiem kwasu octowego lodowatego, d) 2BD wg. La Cour'a (1931); 2. Bouin, modyfikacja Allena; 3. Nawaschin (Naw.), Nawaschin ze zmniejszoną dwukrotnie ilością kwasu octowego (Naw.), oraz Nawaschin z cztery razy mniejszą ilością kwasu octowego (Naw.); 4. Helly; 5. Némec. Utrwalacz Helly'ego stosowałam tylko w korzeniach. Skrawki parafinowe, grubości 12–16 μ , barwiłam fioletem gencjanowym, hematoksyliną i fuksyną kwaśną z zielenią jodową (tylko w korzeniach), pozatem stosowałam reakcję nuklearną.

Najlepsze wyniki w korzeniach otrzymałam na preparatach, utwalanych płynem Helly'ego i zabarwionych kwasem fuksynosiarkawym i na materiale, utwalonym wszystkimi płynami Nawaschina. Z pyłników zaś miałam najlepsze preparaty po utrwaleniu płynami Carnoy Nawaschin i barwieniu fioletem gencjanowym oraz po zastosowaniu płynu 2BD i reakcji nuklearnej. Trzeba jednak podkreślić fakt, że jeden i ten sam utrwalač daje wyniki bardzo różne; widocznie sposób preparowania odgrywa tu dużą rolę.

Probowałam także robić preparaty wyciskane, lecz próby te nie dały pożądaných rezultatów.

II. Chromozomy somatyczne (analiza garnituru).

Stadja najbardziej nadające się do analizy garnituru chromozomów somatycznych u *Oenothera*, to profaza — od średniej aż do późnej — i metafaza. Jądra profazowe są stosunkowo małe (tak jak wszystkie zresztą jądra chromocentrowe). Średnica ich wynosi średnio 8 μ .

W średniej profazie chromozomy są dość cienkie, długie i falisto powyginane (Rys. 1, Tabl. II.). Ich struktura wewnętrzna jest niewidoczna. Pierwotne przewężenia leżą tuż pod błoną jądra, oba ramiona zaś sięgają często do środka jądra. Przewężenia nie zawsze są dobrze widoczne. Najwyraźniej odznaczają się one na preparatach zabarwionych kwasem fuksynosiarkawym, jako jaśniejsze przerwy w chromozomach. Środkowe części chromozomów,

leżące po obu stronach przewężeń pierwotnych, są najsilniej skondensowane¹⁾ — są one najgrubsze i najsilniej się barwią. Prawie we wszystkich chromozomach kondensacja na dalszych odcinkach jest słabsza, przyczem w niektórych chromozomach przejście od części mocno do słabo skondensowanej jest raptowne, w innych stopniowe. Końce chromozomów tworzą bardzo cienkie nici. Barwią się — chociaż bardzo słabo — kwasem fuksynosiarkawym, nie można więc wątpić o ich chromatynowym charakterze. Na końcach cienkich, nieskondensowanych części chromozomów znajdują się (w sześciu parach) małe, silnie barwiące się chromatynowe ziarenka. Parę rysunków chromozomów skondensowanych niejednakowo na całej swej długości podaje Heitz dla *Oe. muricata*. Na końcu jednego z chromozomów widać małe ziarenko, odpowiadające utworom, opisywanym przezemnie (1929, Fig. 15).

W miarę postępowania profazy chromozomy ulegają dalszej kondensacji i coraz to bardziej się wyprostowują (Rys. 2—5, Tab. II). Zarówno środkowe części chromozomów, jak ich konce, grubieją i coraz silniej się barwią. Zmiany, jakie zachodzą w końcach chromozomów, są jednak znacznie większe, niż zmiany, jakim ulegają ich części środkowe. Zmiana zabarwienia jest jednak tak duża, że nie można przypisać jej tylko efektowi optycznemu, jaki otrzymujemy przy zwiększaniu grubości zabarwionej warstwy; niewątpliwie zachodzi tu kontrakcja, uwarunkowana zmianami struktury chromozomu; możliwe jest także, jak już wspomniałam wyżej, że towarzyszy im zmiana chemicznego stanu chromozomu.

W późnej profazie (Rys. 5, Tab. II) chromozomy są już prawie całkowicie skondensowane z wyjątkiem końców, nadal zupełnie cienkich, na których znajdują się wyżej wspomniane ziarenka. W tym stadium dopiero uwidocznia się podłużne rozszczepienie chromozomów, przede wszystkim na ich końcach.

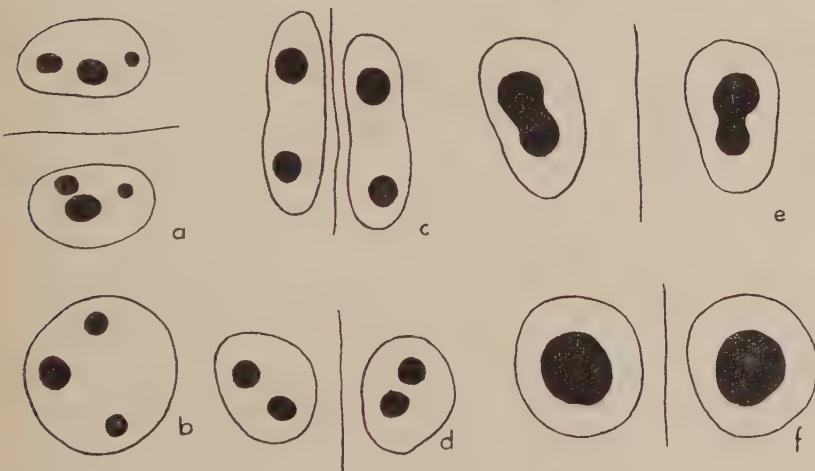
W prometafazie chromozomy są zwykle bardzo zbite i nie można ich dokładnie zbadać.

¹⁾ Kondensacją nazywam proces, który polega na kontrakcji, t. zn. na skracaniu się i grubieniu chromozomów i na coraz to silniejszym wybarwianiu się ich. Ponieważ nie widac nigdy struktury wewnętrznej chromozomów, więc nie mogę przesądzić, czy zmiana zabarwienia wywołana jest tylko kontrakcją chromozomów — przyczyna jej byłaby wtedy tylko mechaniczna — czy też zmianą ich stanu chemicznego. Zagadnieniem nierównej kondensacji zajmuję się nieco dokładniej przy opisie podziału redukcyjnego (prometafaza).

W metafazie proces kondensacji osiąga swe maximum: ulegają jej i końce chromosomów, tak, że ziarenka nie są już widoczne (Rys. 6—8, Tabl. III). I teraz jednak nie wszystkie chromosomy są jednakowo grube na całej swej długości: niektóre ramiona zwężają się stopniowo ku końcowi i nieco słabiej się barwią. Całe chromosomy są w metafazie trochę krótsze niż silnie skondensowane części chromosomów profazowych. Przewężenia pierwotne są nieco mniej wyraźne niż w profazie.

W anafazie kondensacja się zmniejsza i znów uwidaczniają się słabiej zabarwione końce.

Zagadnienie powstawania jąderek w telofazie somatycznej wymagałoby specjalnych badań, które nie mieszczą się w ramach tej pracy. Mogę jednak stwierdzić, że jąderka powstają w określonych miejscach w związku z określonymi chromosomami, na co wskazuje ich symetryczne powstawanie w obu jądrach pochodnych (Ryc. 22). Jednakże jąderka nie tworzą się, a w każdym razie



Ryc. 22.

a — e: jąderka w telofazie somatycznej; *a, b:* jądra z trzema jąderkami; *c, d:* jądra z dwoma jąderkami; *e:* późna telofaza; zlewanie się dwóch jąderek i *f:* jądra spoczynkowe.

nie wyłącznie, w związku z chromosomami satelitowymi, na co wskazuje następujący fakt: u *Oe. Hookeri* jest tylko jedna para satelitowa, tymczasem w średniej telofazie występują często nie dwa, ale trzy lub nawet więcej jąderek, które następnie zlewają się ze sobą. (Potwierdzają to obserwacje nad tworzeniem jąderek

w telofazie podziału redukeyjnego, o których piszę na końcu tej pracy). W późnej telofazie występują przeważnie dwa jąderka, a w spoczynku i w profazie jedno, a wyjątkowo dwa; wtedy jedno jest duże, a drugie znacznie mniejsze.

Chromozomów u *Oe. Hookeri* nie da się wyróżnić na podstawie ich długości, zgodnie z tem, co podkreślali autorzy różnych dawniejszych prac nad innemi gatunkami. Wszyscy zwracali jednak uwagę tylko na metafazę, która daje mniej możliwości zanalizowania garnituru, niż profaza.

Parę typów chromozomów u *Oe. Hookeri* można wyróżnić na podstawie następujących cech: 1) położenia pierwotnego punktu przewężenia, łatwiejszego do ustalenia w profazie, niż w metafazie; 2) występowania satelitów, które w płytach są często niewidoczne spowodu ciasnego ułożenia chromozomów, oraz 3) nierównej kondensacji, dzięki której uwidaczniają się na końcach chromozomów silnie skondensowane ziarenka.

1. W pięciu parach chromozomów przewężenia pierwotne są mniejwięcej środkowe. W szóstej, nieco dłuższej od innych, ramiona są nierówne; różnica między nimi nie jest duża, lecz dostatecznie uchwytana. W pozostałej zaś parze jedno ramię jest mniejwięcej dwa razy dłuższe, niż drugie.

2. Ta właśnie para chromozomów jest jedyną parą, posiadającą satelity. Są one połączone z krótszem ramieniem, którego koniec jest już w profazie silnie skondensowany, w przeciwieństwie do końców większości chromozomów (Rys. 1—4, Tab. II). Satelity są duże, o średnicy nie mniejszej, niż średnica skondensowanych części chromozomów, mniejwięcej kuliste. Z resztą chromozomu łączy je cienka nić, która — jak wskazuje reakcja nuklearna — jest achromatynowa. W profazie satelity leżą z reguły na powierzchni jąderka (Rys. 1 i 3—5, Tabl. II), czasem jednak niezależnie od niego (Rys. 2, Tabl. II). Przyleganie satelitów do jąderka w profazie przemawia za istnieniem związku między satelitami a jąderkiem, ale obserwacje nad telofazą, o których wspomniałam powyżej, świadczą o tem, że tworzenie jąderka uwarunkowane jest nie tylko obecnością satelitów. Parę satelitową w anafazie, jeszcze trudniejszą do znalezienia, niż w metafazie, przedstawia Rys. 9, Tabl. III.

3. W pięciu parach na końcu jednego ramienia każdego z chromozomów znajduje się małe, silnie zabarwione ziarenko, oddzielone od reszty chromozomu słabo skondensowaną częścią. Należą tu cztery pary chromozomów o przewężeniu pierwotnem środ-

kowem i para satelitowa, w której ziarenko znajduje się na końcu dłuższego ramienia, zwężającego się stopniowo. Para chromosomów o ramionach niezupełnie równych posiada dwa takie ziarenka na obu ramionach chromosomów.

Opierając się na wyżej przytoczonych podstawach, można więc wyróżnić następujące typy chromosomów:

Typ	Para	Długość	Przewężenie pierwotne	Satelity	Skondens. ziarenka
I	A	nieco dłuższa od innych	subterminalne	na krótszym ramieniu	1
II	B		submedjalne		2
III	C, D, E, F		środkowe		1
IV	G		środkowe		

Rys. 4, Tab. II, przedstawia jądro, na którym widać chromosomy wszystkich typów (oczywiście nie można z tego rysunku wnioskować o długości chromosomów). Na pozostałych rysunkach z profazy nie wszystkie szczegóły są widoczne — znalezienie jądra, w którym byłyby widoczne wszystkie ziarenka, jest bardzo trudne.

III. Mejoza.

1. Jądro spoczynkowe.

Jądra spoczynkowe komórek macierzystych pyłku zawierają chromocentry, leżące pod błoną jądra. Ilość ich waha się około 14, a więc około diploidalnej liczby chromosomów. Opierając się na tej liczbie i na obserwacjach nad profazą, chromocentry te uważam za prochromosomy. Do tego samego wniosku dochodzą na podstawie swoich obserwacji Davis (1909) i Leliveld (1931). Prochromosomy dają słabszą reakcję na chromatynę, niż chromosomy w stadiach późniejszych. W niektórych prochromosomach widać przewężenie pierwotne i rozszczepienie podłużne. Oprócz prochromosomów widać w jądrze bardzo cienkie nici (Rys. 10, Tabl. III). Po reakcji nuklearnej są one tak słabo widoczne, że trudno powiedzieć, czy nie są wcale, czy też bardzo słabo zabarwione, nie można też odcyfrować ich przebiegu na terenie całego jądra. Widać jednak czasem, że stanowią one (jak wg. G r é-

g o i r e'a i D o u t r e l i g n e j, przedłużenia chromozomów. Na niciach występują czasem małe, nieco silniej się barwiące ziarenka, które wg. wszelkiego prawdopodobieństwa odpowiadają ziarenkom, obserwowanym w profazie somatycznej.

Jądra u *Oenothera* należą zatem do typu jąder prochromozomowych R o s e n b e r g a, czy też euchromocentrowych G r é g o i r e'a. Obserwacje powyższe odnoszą się tylko do *Oe. Hookeri*, ale prochromozomy obserwowałam również u kilku innych form, a mianowicie u *Oe. deserens*, *biennis*, *Lamarckiana* i *Lamarckiana gigas*, a liczne dane z literatury wskazują na tę samą strukturę u wielu innych gatunków.

Dane, dotyczące jądra spoczynkowego, dają w tym wypadku możliwość zrozumienia istoty prochromozomów dopiero w zestawieniu z obserwacjami nad jądrami profazowymi.

2. Wczesna i średnia profaza (od okresu spoczynku do diplotenu).

Początek profazy zaznacza się zmianami, zachodzącymi w prochromozomach i łączącymi się z nimi niciami.

Prochromozomy wydłużają się: ich kształt i zabarwienie stają się nieregularne: uwidaczniają się ciemniej i jaśniej zabarwione części. Nici zaczynają się wybarwiać trochę silniej (Rys. 11, Tabl. III). W stadium tem widać już wyraźnie, że stanowią one przedłużenia prochromozomów. Niestety nie mogłam odcyfrować przebiegu ich na terenie całego jądra, gdyż barwią się jeszcze bardzo słabo, a ułożone są gęsto i prawdopodobnie połączone anastomozami (Rys. 11—13, Tabl. III).

Prochromozomy zaczynają stopniowo układać się parami. Dwa prochromozomy, leżące obok siebie, posiadają taką samą strukturę (jednakowe położenie przewężeń pierwotnych i zabarwienie). Stadium to stanowi początek konjugacji. Układanie się wydłużonych prochromozomów równoległe do siebie, wskazuje na parasyndezę. Podobne obrazy podaje L e l i v e l d (1931). Konjugacja zaczyna się więc w bardzo wczesnym momencie rozwoju chromozomów profazowych. Do najwcześniejszego okresu profazy redukcyjnej u *Oenothera* nie możemy zatem, ściśle biorąc, zastosować terminu „leptoten” — niema tu bowiem stadium, w którym całe nieskonjugowane jeszcze chromozomy, tworzyłyby długie i cienkie nici, jak w jądrach bogatych w chromatynę. Słabo zabar-

wione części chromozomów barwią się stopniowo nieco silniej, ale wciąż jeszcze słabiej niż chromocentry¹⁾.

Obserwacje, przeprowadzone nad *Oe. Hookeri*, *Oe. deserens* i *Oe. Lamarckiana gigas*, wskazują na to, że: 1) Prochromozomy są to — jak twierdzą Heitz, Grégoire i Doutreligne — części chromozomów, które leżą po obu stronach przewężenia pierwotnego i nie tracą w telofazie charakteru chromatynowego; 2) Reszta chromozomu ulega przemianom telofazowym i traci chromatynowy charakter (nie wykazuje reakcji nuklearnej; „Zurückbildung” Heitza, „dechromatinisation” Doutreligne). Wbrew obserwacjom Grégoire’a i Doutreligne

¹⁾ Istota chromocentrów do dziś dnia nie jest jeszcze całkowicie wyjaśniona i poglądy na ich znaczenie są różne. Zpśród prac lat ostatnich, poświęconych temu zagadnieniu, należy wymienić przedewszystkiem prace Heitza oraz Grégoire’a i uczennicy jego, Doutreligne. Wg. Heitza (1929, 1932) chromocentry stanowią określone części określonych chromozomów, które, jako heterochromatyna, „in der Telophase als deutlich färbbare Chromosomenstücke erhalten bleiben, im Gegensatz zum Euchromatin, dass die typische, in ihrem Wesen bis jetzt unbekannte Rückbildung erfährt” (1929). Heterochromozomy, to całe chromozomy, zbudowane z heterochromatyny; prochromozomy — to heterochromatynowe części każdego z chromozomów garnituru „sehr oft in der Nähe des Drehpunktes befindliche”; chromomery wreszcie, to małe heterochromatynowe ziarenka, oddzielone od siebie euchromatynowymi odcinkami.

Grégoire (1932) i Doutreligne (1933) uważają chromocentry — tak jak i Heitz — za części chromozomów, które w telofazie nie ulegają dechromatynizacji i pozostają zabarwione w okresie spoczynku. Są to zawsze krótkie odcinki chromozomu, leżące po obu stronach przewężenia pierwotnego. W interkinezie widoczne są tylko euchromocentry, a indywidualność całych chromozomów zostaje zachowana wg. Grégoire’a „par quelque chose, qui correspond aux substratums achromatiques des chromosomes chromonématiques. Doutreligne stara się sprecyzować to ujęcie: „Nous pensons, que ce corps achromatique” — stanowiące zawartość jądra spoczynkowego poza euchromocentrami i jąderkiem — „comprend des cordons chromosomiques plongeant dans une substance parachromosomique”. Dechromatynizacja owych „cordons chromosomiques” w telofazie polega wg. Doutreligne na zmianie chemicznej, zachodzącej w chromozomach, a mianowicie na zaniku kwasu tymonukleinowego. W profazie zachodzi proces odwrotny.

Do wniosków zupełnie innych dochodzi w swych pracach Eichhorn (1931—1934), wg. którego chromocentry stanowią całkowite chromozomy z poprzedniej mitozy i nie ulegając żadnym przemianom, stają się skolei całkowitymi chromozomami w mitozie następnej. Słuszności jego twierdzeń przeczą jednak zdecydowanie nie tylko wyniki badań Heitza, Grégoire’a, Doutreligne i moje, ale także obserwacje innych autorów.

w jądrze spoczynkowym są jednak widoczne części chromosomów, które ulegają przemianom telofazowym: nie mogłam jednak dokładnie prześledzić ich przebiegu¹⁾.

Dokładnemu prześledzeniu dalszych stadiów profazy redukcyjnej u *Oe. Hookeri* — tak jak i u innych gatunków — staje na przeszkodzie silny i długotrwały skurecz, wskazujący na wielką wrażliwość jądra na działanie utrwalaczy. Możliwe jest także, że na zły wynik utrwalania wpływa wytwarzanie się w tym okresie skrobi, której ziarna wypełniają gęsto całą komórkę i mogą utrudniać przenikanie utrwalających płynów. Obserwacje, dotyczące okresu skureczu, wykazują, co następuje: 1) „Kłębek” chromosomów pozostaje zawsze w związku z jąderkiem. Cleland (1922, 1924, 1926) oraz Gates i Sheffield (1929) opisują małe, ciemno zabarwione ciało, występujące w tym okresie na powierzchni jąderka; pozostaje ono w związku z chromosomami, które w miejscu zetknięcia z niem silniej się barwią. Podobne obrazy widziałam jednak tylko na najgorzej utrwalonych preparatach, gdzie zbite chromosomy zlepione były z jąderkiem.

2) Okres skureczu jest to stadium zygotenu, na co wskazuje równoległe ułożenie chromosomów lub widoczne czasem zaplecenie uniwalentów dokoła siebie (Rys. 14, Tabl. IV).

3) Chromosomy nie są jednolite na całej swej długości — jest to stadium dalszych przemian chromocentrow, które wydłużają się coraz to bardziej i barwią się wciąż jeszcze silniej, niż pozostałe części chromosomów. Środkowe części chromosomów skupione są w centrum kłębka w pobliżu jąderka, a ich końce wystają czasem nazewnątrz.

W pachytenie skurecz jest już słaby, ale środkowe części chromosomów zbite są jeszcze w środku jądra, wskutek czego nie można niestety prześledzić ich dokładnie. W każdym razie chromocentrow już nie ma. Luźniejsze ułożenie końców chromosomów, które, tak jak i w zygotenie, wystają ze środka kłębka, pozwala na stwierdzenie dwóch zasadniczych faktów, a mianowicie:

¹⁾ Obserwacje moje nie pozwalają na wyciąganie wniosków, dotyczących wewnętrznej struktury chromosomów — nie robi tego także Heitz, a Grégoire wnioskuje na podstawie przesłanek rozumowych, że musi istnieć jedna wspólna koncepcja w budowie jąder wszystkich typów, i porównywa jądra euchromocentrowe z jądrami bogatymi w chromatynę. Bez obserwacyj jednak i bez dokładnego sprecyzowania pojęcia chromatyny, od którego dzisiejsza cytologia jest jeszcze daleko, ogólna i dokładna interpretacja, dotycząca prochromosomów, jest niemożliwa.

1) braku ciągłej spiremy (widoczne są wolne końce biwalentów);
 2) podwójności nici pachytenowej. Uniwalenty konjugują jednak tak ściśle, że podwójność w tym stadium rzadko tylko jest wyraźna. Jądro pachytenowe in toto przedstawia Rys. 15, Tabl. IV. Brak ciągłej spiremy i podwójność nici pachytenowej — to zasadnicze momenty, które wskazują na zgodność w profazie heterotypowej u *Oe. Hookeri* z przebiegiem jej u innych „normalnych” obiektów.



Ryc. 23.
 Objaśnienie w tekście, $\times$ ca. 4800.

3. Diploten.

W końcu pachytenu następuje drugi skurcz, uniemożliwiający dokładną analizę wczesnego i średniego diplotenu. I teraz, podobnie jak poprzednio, najsilniej zbijają się środkowe części chromosomów, zwykle koło jąderka; końce ich natomiast wystają z kłębka w postaci charakterystycznych pętli. Niektórzy autorzy uważali je za części dwóch konjugujących uniwalentów (Håkansson, 1926; Cleland, 1926; Illick, 1929), inni zaś za pętle, stanowiące części uniwalentnej spiremy (Weier, 1930). Pętle te, jak wskazuje Ryc. 23, przedstawiająca średni diploten, stanowią końcowe odcinki biwalentów. Środkowe części chromosomów, tak jak w profazie somatycznej, są silniej skondensowane, niż ich końce (Ryc. 23; Rys. 16, Tabl. IV). Rys. 16, Tabl. IV, przedstawia części biwalentów ze średniego diplotenu, w okresie którego parakonjugacja nie podlega żadnej wątpliwości. Skrzyżowania między uniwalentami są dość gęste. Często wy-

glądają one jak zaplecenia uniwalentów dokoła siebie: chiazmy, w sensie wymiany chromatyd między uniwalentami, nie mogłam w tym stadium zaobserwować. Ponieważ jednak chiazmy powstają w okresie wcześniejszym, a obserwowałam je w diakinezie, więc niewątpliwie przynajmniej niektóre ze „skrzyżowań” stanowią właśnie chiazmy.

Analiza całkowitych jąder możliwa jest dopiero od późnego diplotenu (Rys. 17—21, Tabl. IV). Największa zaobserwowana ilość skrzyżowań między uniwalentami wynosi 7 (Rys. 17, Tabl. IV). Podobne rysunki podają Emerson (1931) i Catcheside (1931. „It is probable” — pisze Emerson — „that these features occur commonly in all *Oenotheras* and were seen distinctly in this case only because the preparation was unusually favorable”. Według tego autora mamy tu do czynienia z prawdziwymi chiazmami, ale nie wynika to z jego rysunków. Ten sam pogląd wypowiada Catcheside — jednak i jego rysunki nie są przekonujące. Przewężenia pierwotne widoczne są jako jasniejsze poprzeczne szpary w środkowych, najsilniej skondensowanych częściach chromosomów. Przejście do części słabiej skondensowanych jest zwykle dość raptowne. Tak samo, jak w profazie somatycznej, są one znacznie węższe od części środkowych, a na ich końcach widoczne są często małe, silnie zabarwione ziarenka.

Jeden z biwalentów przylega zwykle jednym końcem do jąderka. Końce chromosomów, leżące na jąderku, są zwykle silnie skondensowane. Zrzadka widać na nich satelity (Rys. 18 i 21, Tabl. IV). Końce drugiego ramienia obu uniwalentów są słabo skondensowane.

Niektóre z biwalentów bywają zaplecione jeden z drugim (Rys. 19, Tabl. IV). Częstość przeplecenia można jednak obliczyć dopiero w diakinezie.

Chromozomy ulegają stopniowo kontrakcji i coraz większej kondensacji. Ilość punktów skrzyżowań między uniwalentami zmniejsza się. Słabo skondensowane końce chromosomów i tu, podobnie jak w profazie somatycznej, skracają się i grubieją stosunkowo znacznie bardziej, niż ich części środkowe. To samo odnosi się do różnicy w zabarwieniu, które staje się stopniowo coraz silniejsze. Wg. Catcheside’a zmniejszenie ilości punktów skrzyżowań między uniwalentami polega na terminalizacji chiazm; na podstawie moich preparatów wnoszę jednak, że przynajmniej częściowo jest ono skutkiem rozplecenia uniwalentów. Maksymalna ilość chiazm, którą podaje Catcheside dla diplotenu, wynosi

cztery dla homozygotycznej *Oe. blandina* (1933a) i trzy dla formy, tworzącej pierścień z sześciu chromozomów i cztery biwalenty (1931a).

4. Diakineza.

W diakinezie biwalenty i jąderko leżą pod błoną jądra. Jąderko jest zwykle jedno, ale czasem prócz jednego dużego występuje jąderko małe, pozostające w ścisłym związku z jednym biwalemtem.

Dzięki zupełnemu rozpleceniu i całkowitej terminalizacji chiazm biwalenty przyjmują w diakinezie kształt pierścieni: w wyjątkowych wypadkach, gdzie jest tylko jedna chiazma terminalna, mają postać pałeczkowatą¹⁾.

Czasem jednak chiazmy nie ulegają całkowitej terminalizacji. Rys. 25, Tabl. IV, przedstawiający chiazmy, w których widać wymianę dwóch chromatyd. Interstitialne chiazmy w diakinezie opisuje również *Catcheside* (1931).

Chromatydy, rzadko wyraźne, są do siebie równoległe.

W biwalencie pałeczkowatym, z jedną chiazmą terminalną, uniwalenty leżą najczęściej równoległe do siebie: punkty zaczepienia w diakinezie nie odpychają się jeszcze, czego konsekwencje widzimy w późniejszych stadiach, a mianowicie w prometafazie i w metafazie.

Przewężenia pierwotne widoczne są, tak jak i w diplotenie, jako jaśniejsze przerwy w chromozomie, najwyraźniejsze po zabarwieniu kwasem fuksynosiarkawym. Kontury chromozomów stają się z biegiem czasu coraz to regularniejsze.

Proces kontrakcji i kondensacji chromozomów trwa w dalszym ciągu. Końce chromozomów stają się coraz to grubsze i w późnej diakinezie osiągają tę samą grubość, co części centralne (Rys. 24 i 27, Tabl. IV), ale barwią się jeszcze słabiej od nich. Charakter połączeń między uniwalentami jest zupełnie wyraźny po zastosowaniu reakcji nuklearnej.

W miarę postępowania kondensacji coraz wyraźniej uwidaczniają się na końcach chromozomów małe, silnie zabarwione ziarenka, które, jak już wyżej wspomniałam, widoczne są czasem już w diplotenie. Są to te same utwory, które obserwowawa-

¹⁾ Fakt, że biwalenty w diakinezie przybierają kształt pierścieni, świadczy wg. *Darlingtona* (1931) o tem, że ich części środkowe odpychają się najsilniej (Rys. 21—24, Tabl. IV) — „the presumably autonomous repulsion of their spindle attachments”).

łam w profazie somatycznej. Kilka biwalentów posiada takie ziarenka na końcach jednego z ramion uniwalentów (typ III: Rys. 26, Tabl. IV), w jednym, nieco większym od innych ziarenka występują na obu końcach uniwalentów (typ II: Rys. 27, Tabl. IV). Dokładne ustalenie w diakinezie liczby biwalentów, które posiadają te ziarenka, nie jest możliwe, gdyż biwalenty rozłożone są mniej więcej równomiernie pod błoną jądra i prawie nigdy nie zdarza się, żeby wszystkie były widoczne napłask, a tylko w tem położeniu można zaobserwować wszystkie ziarenka. W każdym razie we wszystkich obserwowanych jądrach przynajmniej w jednym biwalencie ziarenek tych było brak (typ IV). Podobne ziarenka opisuje Sheffield (1927) oraz Catchside (1931), którzy uważa je za subterminalne chiazmy, „with a very minute distal region”. Pogląd ten uważam za błędny, gdyż w mojem przekonaniu nie ulega wątpliwości, że mamy tu do czynienia z temi samymi silnie skondensowanymi ziarenkami, które występują w profazie somatycznej: przemawia za tem stałość ich występowania i to, że występują tu te same typy chromozomów, co w mitozie. Opisywane przezemnie ziarenka rysują zresztą czasem niektórzy autorzy, nie zwracając jednak na nie należytej uwagi: H a k a n s s o n, 1930; H e d a y e t u l l a h, 1932; E m e r s o n, 1929; D a v i s, 1933).

Jak już wyżej wspomniałam, w niektórych jądrach diakinezowych występują czasem oprócz pierścieni biwalenty pałeczkowate. Obserwacje, przeprowadzone na 130 całkowitych jądrach, dały następujący wynik: w 42 jądrach było siedem pierścieni, w 85 jądrach — sześć pierścieni i jeden biwalent pałeczkowaty i w trzech jądrach — pięć pierścieni i dwa pałeczkowate biwalenty. Różne dane wskazują na to, że biwalent pałeczkowaty jest parą chromozomów satelitowych (para A), chociaż w wyjątkowych wypadkach i inne biwalenty mogą posiadać tylko jedną chiazmę terminalną.

Słuszność tego przypuszczenia potwierdzają zarówno wnioski, wyprowadzone drogą pośrednią, jak i bezpośrednie obserwacje. Dokładne obserwacje nad 70 nieprzeziętymi jądrami wykazały, co następuje:

1) w 32 jądrach było siedem biwalentów — pierścieni, z których jeden przylegał do jąderka. Typowe biwalenty „przyjaderkowe” przedstawia Rys. 28, Tabl. IV. Na podstawie dzisiejszych wiadomości o związku chromozomów satelitowych z jąderkami i na podstawie moich obserwacyj, wykazujących związek satelitów

z jąderkiem w profazie somatycznej, możemy już przypuszczać, że biwalet „przyjąderkowy” jest właśnie parą satelitową. Wniosek ten potwierdzają obserwacje nad pozostałymi spośród 70 badanych jąder, a mianowicie:

2) w 38 jądrach występowało sześć biwalentów — pierścieni i jeden biwalent pałeczkowaty (Rys. 29, c, d, Tabl. V). W żadnym z tych jąder nie było biwalentu „przyjąderkowego”, natomiast czasem koniec jednego uniwalentu, wchodzącego w skład biwalentu pałeczkowatego, leżał na jąderku.

Z obserwacji powyższych wypływa wniosek, że ta właśnie para chromosomów, która w jednych jądrach posiada kształt pierścienia i przylega do jąderka, w innych tworzy biwalent pałeczkowaty. Wiadomą jest rzeczą, że związek jąderka z chromosomem, uwarunkowany tworzeniem jąderka w telofazie, nie zachowuje się przez cały czas profazy. W tym wypadku związek ten przerywa się przed diakinezą lub we wczesnej diakinezie (jądra z sześcioma pierścieniami i biwalentem pałeczkowatym) lub też trwa aż do prometafazy (jądra z siedmioma pierścieniami).

Bezpośrednie obserwacje nad postacią biwalentu „przyjąderkowego” i pałeczkowatego potwierdzają ten wniosek. A mianowicie końce biwalentu pałeczkowatego, połączone ze sobą, i końce chromosomów pary „przyjąderkowej”, nieprzylegające do jąderka — są długie i słabo skondensowane, tak jak dłuższe ramiona chromosomów satelitowych w profazie i w metafazie somatycznej. Dodać muszę, że w biwalencie pałeczkowatym widoczne jest czasem przewężenie pierwotne, wykazujące różnoramienną budowę tworzących go chromosomów, a jedyną parą różnoramienną, jak mogłam stwierdzić w mitozie, jest właśnie para satelitowa.

Satelity, jak już parokrotnie wspomniałam, bardzo rzadko są widoczne w podziale redukcyjnym i tem się tłumaczy fakt, że dotychczas nikt z wyjątkiem C a t c h e s i d e'a (1933a) nie obserwował ich w meiozie u *Oenothera*.

W wyjątkowych wypadkach w jądrach diakinezowych są dwa biwalenty pałeczkowate (w trzech jądrach na 130 obserwowanych), z czego wynika, że nie tylko para satelitowa, ale i inne mogą posiadać tylko jedną chiazmę terminalną. Nie mogę jednak przesądzić, czy dotyczy to wszystkich par, czy tylko kilku, czy jednej.

W wielu jądrach diakinezowych występuje przeplecenie biwalentów (interlocking).

Obserwacje, przeprowadzone na 138 całkowitych jądrach, wykazały, że z przeplecionymi biwalentami mamy do czynienia w 44%, a więc mniej więcej w połowie jąder. Typy przeplecienia są różne, a mianowicie: najczęściej w jednym jądrze są zaplecione dwa pierścienie (32,6%), potem dwie pary pierścieni niezależnie od siebie (5,1%), następnie trzy pierścienie jeden w drugim (4,4%), wreszcie cztery pierścienie (1,4%) i pięć pierścieni (0,7%), jedyny zaobserwowany wypadek). (Por. ryc. 25—27).

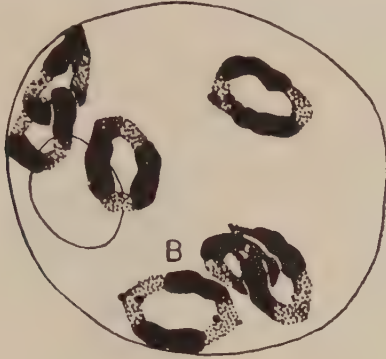


Ryc. 24.
Diakineza. $\times$ ca. 4800.

W przepleceniu mogą brać udział następujące biwalenty: para satelitowa A, para ze skondensowanymi ziarenkami na obu końcach chromosomów, biwalenty z ziarenkiem na jednym końcu (typ III) i para nieposiadająca ziarenek (G), a zatem wszystkie wyróżnione typy chromosomów. Nie mogę jednak stwierdzić, czy wszystkie pary typu III (C, D, E, F) mogą być przeplecione — a trudno zjawisko interlocking uznać z góry za przypadkowe. Na zasadzie własnych preparatów nie mogłam ustalić, na czym polega przeplecenie: czy jest to przeplecenie całych chromosomów, czy też wchodzi tu w grę przeplecenie chromatyd, jak tego dowodzi Catcheside (1931) oraz Sax i Anderson (1934). Mogę tylko stwierdzić, że miejsce zetknięcia dwóch zaplecionych pierścieni bywają bardzo różne — zdarzają się wszystkie trzy możliwe kombinacje przylegania do siebie części silnie i słabo skondensowanych. (Ryc. 25—27, Rys. 22, 24 i 30, Tabl. IV i V).

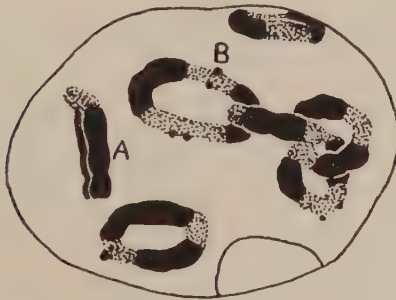
W formie, badanej przez Catcheside'a, przeplecenie występuje mniej więcej w 50% jąder, tak jak u *Oe. Hookeri*. Autor

wyciąga stąd wniosek, że jest to zjawisko przypadkowe. Jednakże wniosek ten nie jest całkowicie uprawniony, a obliczenia G a t e s'a i G o o d w i n (1931) wskazują na to, że częstość przeplecenia jest niejednakowa w różnych gatunkach: u *Oe. Blandina* występuje w 74% komórek macierzystych, a u *Oe. purpurata*



Ryc. 25.

Diakineza. Cztery biwalenty przeplecione. $\times$ ca. 4800.



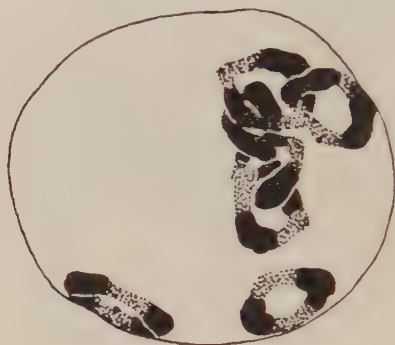
Ryc. 26.

Diakineza. Przeplecenie czterech biwalentów. $\times$ ca. 4800.

w 43%. Dane powyższe wskazują na to, że przeplecenie nie występuje tylko przypadkowo, lecz ma prawdopodobnie głębszą przyczynę. Badania nad formami haploidalnymi wskazują na możliwość reduplikacji genów w garniturze haploidalnym: jest to właśnie przyczyną przeplecenia chromosomów w formach diploidalnych.

W jednym z kilkuset dokładnie zanalizowanych jąder diakinezowych zaobserwowałem pierścien z czterech chromosomów

(Rys. 30, Tab. V). Wskazuje to na możliwość tworzenia pierścieni także i u homozygotycznej *Oe. Hookeri*. *Oe. Hookeri* jest formą wyjątkowo stałą. Od szeregu lat hodowana przez genetyków nie wytwarza nigdy nowych form w warunkach naturalnych. Powstają one dopiero pod wpływem działania radu, narkotyków, soli metali ciężkich i t. p. (Michaelis, 1930). Dotychczasowe obserwacje cytologiczne, aczkolwiek nieliczne, nie wykazały również jakichkolwiek zakłóceń; pyłek jest w 100% normalny.

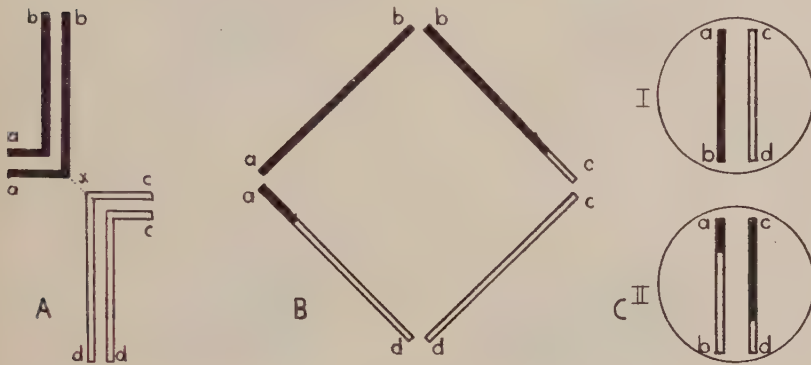


Ryc. 27.

Diakineza: przeplecenie 5 biwalentów. $\times$ ca. 4800.

Wystąpienie w całej komórce pyłkowej pojedynczej komórki z czterochromozomowym pierścieniem ma pewne znaczenie teoretyczne, a mianowicie upoważnia do wniosku, że wymiana między niehomologami, dzięki której powstaje pierścień z czterech chromozomów, nastąpiła nie wcześniej, niż po ostatnim podziale somatycznym komórki archesporjalnej: gdyby bowiem miała miejsce wcześniej, w jakimkolwiek stadium rozwoju somatycznego rośliny, komórek macierzystych z pierścieniami byłoby więcej. Darlington, (1931, Cleland i Blakeslee (1930) i in. uważają takie właśnie pojedyncze wymiany, prowadzące do utworzenia pierścienia z czterech chromozomów, za pierwszy krok w kierunku tworzenia pierścieni większych: rezultatem następnej wymiany jest utworzenie pierścienia z sześciu chromozomów, i tak dalej, aż po sześciu wymianach powstanie pierścień czternasto-chromozomowy, jaki występuje u wielu *Oenother*. Po meiozie, w której następuje wymiana, powstaną gamety dwóch typów (I i II). W obu typach skład genetyczny pozostaje ten sam, ale

ułożenie genów na końcach chromozomów jest różne: w typie I takie samo, jak w formie rodzicielskiej, w typie II inne. W konsekwencji tego gameta typu II po połączeniu z gametą normalną — zarówno przy samozapłodnieniu, jak i w wypadku skrzyżowania — da początek formie o odmiennej konfiguracji chromozomów, niż gameta powstała bez uprzedniej wymiany lub gameta typu I, powstała po wymianie. (Ryc. 28) ¹⁾.



Ryc. 28.

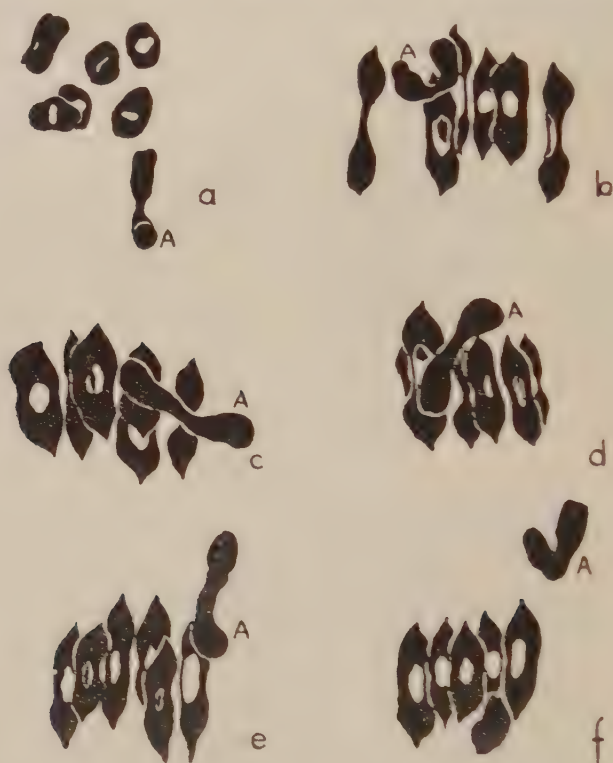
Schemat wymiany między niehomologami w formie homozygotycznej; A — stadium, w którym następuje wymiana między niehomologami *ab* i *cd* (*x* — punkt, w którym następuje wymiana); B — pierścień diakinezy, powstały wskutek wymiany; C — dwa typy gamet (I i II), utworzonych po podziale redukcyjnym.

¹⁾ Wystąpienie w hodowli formy, różniącej się od innych wyłącznie konfiguracją chromozomów, opisuje Cleland (1932): w krzyżówce *Oe. Hookeri* × *Oe. franciscana* — osiem z dziewięciu zbadanych roślin miało w diakinezie siedem bivalentów, a w jednej jądra diakinezy zawierały pięć par oraz pierścień z czterech chromozomów. Wg. Clelanda przyczyną tego zjawiska jest najprawdopodobniej fakt, opisany wyżej przeze mnie, a mianowicie pojedyncza wymiana w meiozie u jednej z form rodzicielskich, w danym wypadku u *Oe. franciscana* lub u *Oe. Hookeri*. Ciekawą jest rzeczą, że oba te gatunki są formami homozygotycznymi. U *Oe. purpurata*, tworzącej w diakinezie siedem par, Gates i Goodwin (1931) obserwowali we wszystkich komórkach macierzystych jednego pączka pierścień z pięciu i dwa łańcuchy po trzy chromozomy. W tym wypadku wymiana musiała nastąpić w jednym z podziałów somatycznych, poprzedzających rozwój pączka. Rysunki, ilustrujące ten przykład, nie są jednak przekonujące.

5. Prometafaza.

W końcu diakinezy wytwarza się wrzeciono. Początkowo jest ono wielobiegunowe, potem zaś, od chwili rozpuszczenia jąderka i zaniku błony jądrowej, dwubiegunowe.

Chromozomy skupiają się ku środkowi komórki, w głębi terenu wrzeciona. Początkowo ułożenie ich w stosunku do osi wrze-



Ryc. 29.

Prometafoza. a: chromozomy ułożone dowolnie w stosunku do płaszczyzny podziału; b — f: stadium nieco późniejsze: opóźnienie pary A. $\times$ ca. 4800.

ciona jest dowolne. (Ryc. 29, Rys. 31, Tabl. V), stopniowo jednak punkty załączenia dwóch konjugujących uniwalentów wyciągają się ku przeciwnym biegunom, przybierając charakterystyczny dzióbkowaty kształt. Para A, tworząca palczkowaty biwalent, opóźnia się w stosunku do innych (Ryc. 29b—29f). Podczas, kiedy wszystkie chromozomy są już na równiku i kształt ich odpowiada ostatecznemu kształtowi biwalentów metafazowych, para A znajduje się zwykle jeszcze poza równikiem i położenie jej

w stosunku do osi podziału jest dowolne, a oba uniwalenty często nie są jeszcze wyprostowane (Ryc. 29b, e, f). Opóźnienie się pary satelitowej w prometafazie i fakt, że uniwalenty stanowiące parę A, zaczynają odpychać się wzajemnie później, niż inne chromozomy, świadczy o tem, że istnieje jakaś przyczyna powodująca odmienne zachowanie się tej pary w meiozie. W rezultacie para A w metafazie leży zawsze z brzegu płytki.

Przeplecenie w prometafazie bywa czasem widoczne, ale statystyczne obliczenie jego częstości jest w tem stadium niemożliwe.

Kondensacja chromosomów osiąga w tem stadium swe maximum. W prometafazie późnej biwalenty są trzy do czterech razy krótsze, niż w średnim diplotenie. Ponieważ przed metafazą końce chromosomów są równie silnie skondensowane, jak ich części środkowe, przeto ziarenka znajdujące się na nich, stają się niewidoczne. Obserwacje moje nad nierówną kondensacją chromosomów w profazie podziału redukcyjnego są zgodne z obserwacjami Bellinga (1928, Darlingtona (1933) i Geitlera (1933) nad *Agapanthus umbellatus* i *Kniphofia aloides*, z tą różnicą, że u *Oenothera* niema chromomerów, które pozwoliłyby na bliższą analizę zjawiska kondensacji.

Zestawienie obserwacji nad kondensacją chromosomów u *Oe. Hookeri* w meiozie i w mitozie wykazuje zupełną zgodność w przebiegu procesu kondensacji w podziałach obu typów.

6. Metafaza.

Biwalenty u *Oe. Hookeri*, jak wyżej zaznaczyłam, nigdy nie układają się w płytkę w ścisłym znaczeniu tego słowa. Tworzą one zawsze dwie wyraźne grupy, skierowane ku dwóm biegunom wrzeciona (Rys. 32, Tabl. V). Odległości pomiędzy sąsiednimi chromosomami w każdej grupie są mniej więcej równe.

W silnie skondensowanych chromosomach metafazowych połączenia między uniwalentami tworzą cienkie końce chromatyd, które barwią się słabiej, niż pozostałe części chromosomów. Dzięki temu znane nam już ziarenka na końcach chromosomów stają się znów widoczne.

Chromatydę leżą do siebie równolegle. W punkcie zaczepienia widoczny jest jakgdyby dziobek, wyciągnięty ku biegunowi; barwi się on znacznie słabiej, niż reszta chromosomu. Po re-

akcji nuklearnej pozostaje on prawie wcale niezabarwiony — jest to przeto achromatynowe przewężenie pierwotne.

W metafazie, podobnie jak i w diakinezie, występują, choć bardzo rzadko, niesterminalizowane chiazmy, znane z prac H a k a n s s o n a (1930), D a r l i n g t o n a (1931) i C a t c h e s i d e'a (1931). Powstają wtedy „krzyże” wskutek tego, że ramiona chromosomów po obu stronach chiazm leżą w płaszczyznach do siebie prostopadłych.

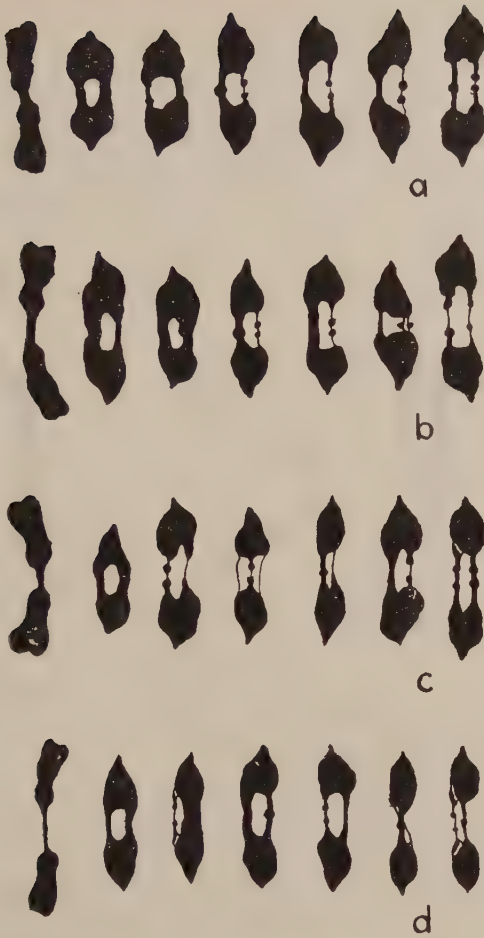
Przeplecenie biwalentów w metafazie nie zostaje przerwane. W tem stadium jednak, tak jak i w prometafazie, statystyczne obliczenie jego częstości nie jest możliwe, gdyż te chromosomy obu zaplecionych biwalentów, które są skierowane ku jednemu biegunowi, leżą bardzo blisko siebie, co ogromnie utrudnia obserwację. Ta trudność jest niewątpliwie przyczyną, dla której niektórzy autorzy twierdzą, że zaplecone biwalenty uwalniają się już przed metafazą (C a t c h e s i d e, 1931; G a t e s i G o o d w i n, 1931 i in.).

Metafaza jest stadium meiozy, najlepiej nadajacem się do analizy garnituru chromosomów dzięki temu, że—jak już wspominałam — widoczne są silnie skondensowane ziarenka na końcach chromosomów (Ryc. 30, Rys. 33 i 34, Tabl. V). Fakt ten jest bardzo ważny dla form, tworzących pierścienie, gdyż umożliwia bezpośrednią obserwację obu kompleksów i dzięki temu może oddać duże usługi w cytogenetycznych badaniach nad *Oenotherami*.

Badania nad garniturem chromosomów w metafazie redukcyjne dały następujące rezultaty:

1. *Para A* tworzy pierścień lub biwalent pałeczkowaty, leżący zawsze z brzegu płytki (por. z prometafazą). Satelitów nigdy nie widać. Chromosomy tej pary połączone są dłuższymi ramionami. Położenie punktów zaczepienia jest często widoczne dzięki esowatemu wygięciu całego bivalentu. Na wolnych końcach chromosomów widoczne są bardzo często obie chromatydę; nie przylegają one tak ściśle do siebie jak w innych miejscach i dzięki temu są dobrze widoczne. (Ryc. 31).

2. *Para B*, która posiada silnie skondensowane ziarenka na obu końcach chromosomów, wyróżnia się nieco od innych swą wielkością i tem, że końce chromosomów, oddzielające ich silnie skondensowane części, są często trochę dłuższe, niż w innych biwalentach. Dzięki temu chromosomy tej pary robią wrażenie bardziej rozsuniętych.



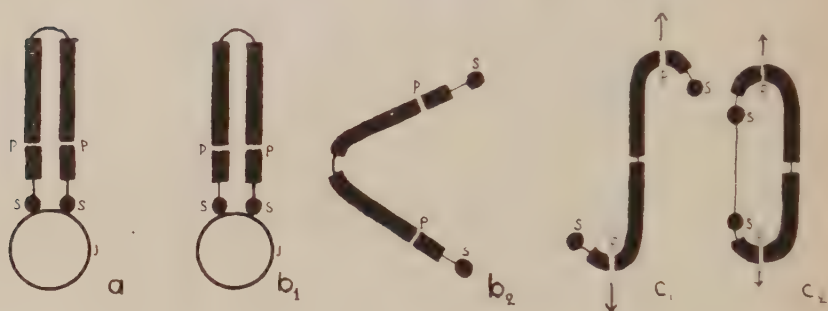
Ryc. 30.
Metafaza. $\times$ ca. 4800.

3. Pary C, D, E, F, posiadające ziarenka na jednym ramieniu chromosomów (typ III) można wyróżnić tak samo, jak i w profazie somatycznej, ale obrazy nie są zawsze wyraźne, gdyż połączenia między chromosomami są czasem dość grube, a wtedy ziarenka nie są widoczne.

4. To samo dotyczy pary G, nieposiadającej ziarenek; połączenia między chromosomami są nieraz znacznie grubsze, niż w innych parach.

Obserwacje nad chromosomami diakinezowymi i metafazowymi dały więc ten sam wynik, co obserwacje, przeprowadzone dla zanalizowania garnituru w profazie somatycznej.

W związku z wynikami, jakie otrzymałem, nasuwa się następujące pytanie: dlaczego z pośród wielu cytologów, którzy badali specjalnie diakinezę i metafazę u *Oenothera*, nikt nie zwrócił uwagi na występowanie silnie skondensowanych ziarenek, które pozwalają przecież na wyróżnienie kilku typów chromosomów? Przyczyna tego faktu jest najprawdopodobniej natury technicznej: ziarenka są dobrze widoczne tylko na najlepiej utrwalonym materiale, w którym chromosomy w płycie nie są zbite. Analiza



Ryc. 31.

Schemat, przedstawiający zachowanie się pary satelitowej w meiozie: a — diploten; b — diakineza; c — metafaza; s — satelit; j — jąderko; p — przewężenie pierwotne.

płytek jest bardzo żmudna, gdyż trudno jest znaleźć płytkę, gdzie wszystkie połączenia między chromosomami są widoczne: w żadnym z siedmiu biwalentów oba połączenia nie mogą leżeć jedno pod drugim, pozatem nie nadają się do analizy płytki, w których są przeplecione biwalenty. Ważną rzeczą jest wreszcie zabarwienie preparatów: dotychczas stosowano prawie wyłącznie hematoksylinę, po której trzeba preparaty silnie różnicować, aby odbarwić cytoplazmę; przy silnem zaś różnicowaniu odbarwiają się także omawiane ziarenka. Dobre wyniki, choć także niezawsze, daje zabarwienie fioletem genejanowym oraz kwasem fuksynosiarkawym, którego dotychczas nikt dla *Oenother* nie stosował.

Wszystkie powyżej wymienione względy wpłynęły przypuszczalnie na to, że dotychczas nikt z pośród cytologów, pracujących nad *Oenotherami*, nie zwrócił uwagi na stałość występowania opisywanych przezemnie ziarenek, chociaż widoczne są one na rysunkach wielu autorów (Sheffield, 1927; Cleland i Oehlkers, 1929; Gates i Goodwin, 1931; Catcheside, 1931 i 1933a; Hedayetullah, 1932; Davis in.).

7. Anafaza.

Po metafazie chromozomy rozchodzą się bardzo szybko ku biegunom. Aż do końca anafazy chromozomy są równie silnie skondensowane, jak w metafazie, czem różnią się od chromozomów anafazowych w mitozie (Rys. 38—40; Tabl. V). Tylko w wyjątkowych wypadkach widoczne są ziarenka, oddzielone od reszty chromozomu słabiej zabarwioną częścią. Oba silnie skondensowane ramiona chromozomów, tak, i w metafazie, przylegają do siebie. Dopiero w końcu anafazy zaczynają się rozsuwać (Rys. 43, Tabl. V). Przewężenie pierwotne, rzadko zresztą widoczne, i w tem stadium wyglądają jak jaśniejsze pasy idące wpoprzek chromozomu.

Analiza u *Oe. Hookeri* przebiega zupełnie regularnie; nigdy nie obserwowałem jakichkolwiek zakłóceń. Prawdłowy przebieg anafazy warunkuje tworzenie 100% dobrego pyłku, co wielokrotnie stwierdzali zarówno cytologowie, jak i genetycy.

8. Telofaza i interkineza.

Jeszcze przed obłonieniem się jądra chromozomy zaczynają się słabiej barwić (Rys. 42, Tab. V). Z chwilą zaś wyodrębnienia się błony jądrowej chromozomy ulegają znacznym przemianom. Oba ramiona każdego z uniwalentów odsuwają się całkowicie od siebie i chromozomy na całej swojej długości przylegają do błony jądra. Jednocześnie uwidacznia się rozszczepienie chromozomów. Obie chromatydy połączone są w punkcie zaczepienia, a końce ich oddalają się od siebie, tak, że chromozomy przybierają postać krzyży (Rys. 43 i 44, Tabl. V). W miarę rekonstrukcji jąder pochodnych, wydłużają się one i stopniowo coraz słabiej się barwią. (Rys. 45 — 47, Tab. V). W później telofazie chromozomy dają już bardzo słabą reakcję na kwas tymonukleinowy. Następnie znowu trochę się skracają, grubieją i w interkinezie „krzyże” stają się bardziej regularne. Barwią się też trochę mocniej po Feulgenie, a dużo mocniej po fiolecie genejanowym i hematoksylinie. Właściwego okresu spoczynku niema — po krótkiej interkinezie następuje drugi podział meiotyczny.

Tworzenie jąderek w telofazie redukcyjnej przebiega w sposób następujący: w chromozomach pojawiają się bezkształtne masy jakiejś substancji (Rys. 46 i 47, Tabl. V), które następnie wydzielają się w formie kul (Rys. 47—50, Tabl. V). Substancja ta powstaje w kilku chromozomach — przynajmniej sześciu (Rys. 49, Tabl. V), a może we wszystkich siedmiu. W interkinezie są już

tylko kule, które często tracą związek z chromozomami i zlewają się ze sobą, tworząc jedno, a częściej dwa lub trzy większe jąderka, które pozostają najczęściej w kontakcie z chromozomami (Rys. 50, Tabl. V).

Substancję, wydzielającą się z chromozomów w postaci kul, uważam za substancję jąderkową nie tylko dlatego, że obserwacje różnych stadiów telofazowych i interkinezy narzucają taką interpretację, ale także na podstawie barwienia się jej, a mianowicie: 1) Nie barwi się kwasem fuksynosiarkowym — nie jest więc chromatyną. Po zastosowaniu reakcji nuklearnej kule pozostają zupełnie bezbarwne i dlatego są trudne do zaobserwowania, że są bardzo małe. Z tej samej przyczyny po zastosowaniu tej metody nie mogłam przeprowadzić dokładnych obserwacji nad wcześniejszym stadiem, a mianowicie nad wytwarzaniem mas owej substancji (Rys. 45, Tabl. V).

2) Po utrwaleniu płynem 2BD i wybarwieniu fioletem gen-cjanowym substancja ta barwi się silniej, niż chromozomy — tak jak na innych preparatach jąderka (Rys. 46—49, Tabl. V).

3) Po zastosowaniu utrwalacza *Bouin-Allen* i hematoksyliny barwi się tak, jak gdzieindziej jąderka — słabiej niż chromatyna (Rys. 49 i 50, Tabl. V).

Te same zjawiska, związane z powstaniem jąderek, występują w telofizie drugiego podziału meiotycznego.

Obserwacje moje nad *Oe. Hookeri*, podobnie, jak dane *Doutreligne* (1933), *Dermena* (1933) i *McClintock* (1934) dotyczące jąderka, świadczą o tem, że powstawanie jąderek nie jest uzależnione wyłącznie od pary satelitowej. Niestety jednak ani w telofazie, ani w interkinezie u *Oe. Hookeri* satelity nie są widoczne. Jak pisałam już na początku tej pracy, chromozomy pary A przylegają w profazie somatycznej do jąderka — istnieje więc jakiś związek między jąderkiem a satelitami, nie wiem jednak, na czym on polega. Przypomina to stosunki, panujące u *Zea Mays*: w profazie somatycznej satelity leżą na jąderku; w tych wypadkach, gdzie w telofazie tworzy się wiele jąderek, największe z nich lub jedynie, jakie powstaje po zlaniu się kilku jąderek, jest również w kontakcie z chromozomem satelitowym. Dotychczas jednak nikomu nie udało się zbadać istoty zależności, jaka istnieje między jąderkami a chromozomami satelitowymi.

Pierścienie chromozomowe w podziale redukeyjnym występują nie tylko u *Oenothera*, ale i u wielu innych rodzajów i gatunków. Tworzenie pierścieni stwierdzono dotychczas u *Godetia amoena* (Håkansson, 1925), *Rumex acetosella* (Kihara, 1927), *Rhoeo discolor* (Belling, 1927), *Datura* (Belling i Blackeslee, 1926), *Aucuba japonica* (Meurmann, 1929), *Pisum* (Håkansson, 1929), u *Zebrina pendula* i u różnych gatunków *Tradescantia* (Miyake, 1905, Darlington, 1929b), *Clarkia* (Håkansson, 1931), *Matthiola incana* (Philps i Huskins, 1931), *Briza* i *Anthoxanthum* (Katterman, 1931), *Rosa* (Erlanson, 1931), *Zea* (Burnham, 1930), *Campanula persicifolia* (Gairdner i Darlington, 1931), *Hypericum* (Hoar, 1931), *Brodiaea* (Smith, 1933), *Festuca pratensis* i *Poa pratensis*.

Tu przeto nasuwa się pytanie, dlaczego w niektórych rodzajach pierścienie są bardzo rozpowszechnione, jak u *Oenothera*, w innych występują sporadycznie, jak u *Rosa* i *Datura*, w większości zaś roślin nie tworzą się nigdy. Tam, gdzie pierścienie występują w wielu gatunkach w obrębie jednego rodzaju, osiągają one często duże rozmiary, t. zn. często w skład ich wchodzi większość lub wszystkie chromozomy — u *Oenothera* np. w wielu gatunkach są pierścienie czternastochromozomowe. Natomiast w tych rodzajach, gdzie pierścienie występują bardzo rzadko, w niektórych tylko gatunkach lub mieszańcach, są one z reguły małe — a często zamiast pierścieni tworzą się krótkie otwarte łańcuchy.

W świetle hipotezy Bellinga, tłumaczącej powstawanie pierścieni na drodze wymiany między niehomologami, możliwa jest tylko jedna interpretacja cytologiczna tych faktów, a mianowicie w pewnych rodzajach, np. u *Oenothera*, wymiany części między niehomologami zachodzą często, t. zn. zarówno w wielu gatunkach tego rodzaju, jak i w jednym gatunku, wskutek czego powstają duże pierścienie. W innych rodzajach zaś, np. u *Rosa*, wymiany są rzadkie — pierścienie tworzą się w niewielu gatunkach i nigdy nie osiągają większych rozmiarów. W większości rodzajów wreszcie pierścienie nie powstają nigdy. Ponieważ gatunki jednego rodzaju stanowią grupę, przedstawiającą ten sam typ karjologiczny, nasuwa się przypuszczenie o związku przyczynowym między możliwością tworzenia pierścieni a typem jądra. Związku tego należało zresztą oczekiwać już z góry, a mianowicie łatwość pęknięcia i łączenia się pękniętych części chromozomów muszą być uwarunkowane strukturą jądra i chromozomów.

Uzasadnienie to może leżeć w różnej strukturze różnych części chromozomów. Narazie za mało jeszcze wiemy o strukturze jądra, aby móc przeprowadzić szerszą i dokładniejszą analizę porównawczą dla sprawdzenia tego przypuszczenia. Znajduje ono jednak potwierdzenie w badaniach nad *Oenothera*. Kilku autorów zwróciło uwagę na nierówną kondensację chromozomów. w pracach innych cytologów występowanie jej potwierdzają ich rysunki, a wreszcie u *Oe. Hookeri* mogłam stwierdzić nie tylko różnice w kondensacji środkowych części chromozomów i ich ramion, ale też zróżnicowanie samych końców chromozomów w postaci silnie skondensowanych ziarenek, leżących na słabo skondensowanych końcach ramion.

Zpośród roślin, u których stwierdzono występowanie pierścieni, bliżej zbadana jest *Zea Mays*. I w tym gatunku chromozomy wykazują pewne zróżnicowania w swej budowie (satelity chromatynowe zgrubienia (t. zw. „knobs” i „nucleolar organizing body”).

Należy jednak podkreślić fakt, że pierścienie mogą się tworzyć w jądrach, strukturalnie różniących się bardzo między sobą, np. u *Oenothera*, posiadającej jądra z prochromozomami, u *Pisum*, w jądrach którego występuje wiele małych chromocentrów, i u *Tradescentia*, której jądra, bogate w chromatynę, należą do zupełnie innego typu. U większości jednak rodzajów, tworzących pierścienie, jądra posiadają chromocentry, a wiadomo, że w jądrach tego typu chromozomy są strukturalnie zróżnicowane.

STRESZCZENIE.

1) Jądra u *Oe. Hookeri* należą do typu jąder ubogich w chromatynę, zawierających prochromozomy. Prochromozomy te stanowią części chromozomów, leżące po obu stronach przewężenia pierwotnego. W telofazie nie ulegają one „dechromatyzacji”, która zachodzi w pozostałych częściach chromozomów. Prochromozomy w jądrze spoczynkowym są już rozszerepione podłużnie.

Chromozomy w mitozie i w meiozie wykazują zróżnicowanie części, przejawiające się 1) w wykształceniu chromocentrów w telofazie; 2) w rozwoju chromozomów we wczesnej profazie

oraz 3) w nierównej kondensacji w późniejszej profazie. Środkowe części chromosomów, leżące po obu stronach przewężenia pierwotnego, są najsilniej skondensowane, pozostałe zaś części słabiej. Na końcach 12 chromosomach znajdują się małe, silnie skondensowane ziarenka.

2) Występowanie tych właśnie ziarenek i pary satelitów pozwoliło na wyróżnienie kilku typów chromosomów, które nie różnią się wyraźnie ani długością ani położeniem przewężenia pierwotnego. Analiza garnituru chromosomów, u *Oe. Hoekri* doprowadziła do wyników zgodnych w mitozie i w meiozie. Zestawienie ich daje następująca tablica:

Chromozomy somatyczne	Typy chromozomów	Chromozomy w podz. redukcyjnym.
Średnia profaza	I: para A: Przewężenie subterminalne na krótszym ramieniu, silnie skondensowanym na całej długości, duże satelity: na końcu dłuższego ramienia silnie skondensowane ziarenko. II: para: B: nieco większa od innych: przewężenie submedjalne: silnie skondensowane ziarenka na końcach obu ramion. III: pary C, D, E, F: przewężenie środkowe: na końcu jednego ramienia silnie skondensowane ziarenko. IV: para G: przewężenie środkowe: silnie skondensowanych ziarenek niema.	Diploten i diakineza.
Prometafaza metafaza.	Silnie skondensowane ziarenka niewidoczne.	Prometafaza.
Anafaza. (obserwacje niepełne).	Silnie skondensowane ziarenka widoczne, typy jak wyżej.	Metafaza.

3) Przebieg podziału redukcyjnego jest następujący:

A: konjugacja chromosomów zaczyna się we wczesnej profazie:

a) Zaczyna się ona w bardzo wczesnym stadium rozwoju chromosomów profazowych. Prochromozomy, z chwilą, kiedy zaczynają ulegać profazowym przemianom, układają się parami obok siebie. Fakt, że wydłużone prochromozomy układają się do siebie równolegle, świadczy o parakonjugacji.

b) W stadium zygotenu konjugujące chromozomy są zaplecione dokoło siebie.

c) Podwójność nici pachytenowej dowodzi jej biwalentnego charakteru. Biwalenty nie tworzą spiremy ciągłej; w pachytenie widoczne są ich wolne końce.

d) Uniwalenty w diplotenie są zaplecione dokoła siebie: w niektórych punktach skrzyżowania między nimi są chiazmy.

B: Diakineza. Na skutek rozplecenia uniwalentów i terminalizacji chiazm biwalenty diakinezowe przybierają kształt pierścieni. W 50% jąder występuje przeplecenie biwalentów (interlocking). W jednym z kilkuset dokładnie zanalizowanych jąder występował czterochromozomowy pierścień; świadczy to o możliwości wymian między niehomologami u homozygotycznej formy.

C: Prometafaza. Z chwilą zaniku błony jądrowej i jąderka wytwarza się wielobiegunowe wrzeciono, które potem przekształca się w dwubiegunowe. Chromozomy są już całkowicie skondensowane. Biwalenty skupiają się w środku komórki, przyczem para satelitów opóźnia się zwykle w stosunku do innych.

D: Metafaza. Chromozomy ułożone są w dwóch grupach. Wyjątkowo występują niesterminalizowane chiazmy. Przeplecenie biwalentów trwa dalej.

E: Anafaza. Biwalenty rozchodzą się mniej więcej równocześnie. Przebieg anafazy jest zupełnie prawidłowy.

F: Telofaza. W telofazie uwidacznia się rozszczepienie chromozomów. Chromatydy pozostają połączone tylko w punktach zaczepienia, dzięki czemu chromozomy przybierają kształt krzyży.

4) Tworzenie jąderek. Jąderka w telofazie redukcyjnej wytwarzają się wewnątrz chromozomów w postaci nieregularnych mas substancji, która następnie wydziela się w formie kul. Poszczególne kule zlewają się ze sobą, tworząc większe jąderka. W telofazie somatycznej powstaje również więcej jąderek, niż ilość chromozomów satelitowych. Fakt, że satelity w profazie przylegają do jąderka, przemawia jednak za istnieniem jakiegoś bliżej nieznanego związku między jąderkami a chromozomami satelitowymi.

Pracę niniejszą rozpoczęłam w Zakładzie Botaniki Ogólnej Uniwersytetu Warszawskiego, a skończyłam w Zakładzie Genetyki i Hodowli Roślin Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego.

Uważam za swój obowiązek złożyć bardzo serdeczne podziękowanie Panu Profesorowi Zygmuntowi Wóycickiemu za życzliwą pomoc, której mi nie szczędził w toku mych badań. Dziękuję także najuprzejmiej Panu Profesorowi Edmundowi Malinowskiemu za życzliwy stosunek do mojej pracy i ułatwianie hodowli *Oenother*.

BIBLIOGRAFJA.

- Anderson, J. E., 1933: The genetics and cytology of two fifteen chromosome mutants from the haploid of *Oenothera franciscana*. — Amer. Journ. Bot., 20, 387—414.
- Belling, J., 1927: The Attachments of Chromosomes at the Reduction Division in the Flowering Plants. — Journ. Gen. 18, 177—205.
- Belling, J., 1928: Contraction of chromosomes during Maturation Division in *Lilium* and other Plants. — Univ. Cal. Publ., 14, 335—343.
- Belling, J. and Blakeslee, A. F., 1927: On the attachment of non-homologous chromosomes at the reduction division in certain 25 — chromosome *Daturas*. — Proc. Nat. Acad. Sc., 12, 7—11.
- Boedijn, K., 1924: Die typische und heterotypische Kernteilung der *Oenotheren*. — Zschr. f. Zellen — u. Gewebelehre, 1, 265—277.
- Burnham, C. R., 1930: Genetical and Cytological Studies of Semisterility and related Phenomena in Maize. — Proc. Nat. Acad. Sc., 16, 269—277.
- Capinpin, A., 1930: Meiotic behaviour of triploid *Oenotheras*. — Amer. Nat., 64, 566—570.
- Catcheside, D. G., 1931: Critical evidence of parasynapsis in *Oenothera*. — Proc. Roy. Soc. B., 109, 165—184.
- Catcheside, D. G., 1933a: The chromosomes of a new haploid *Oenothera*. — Cytologia, 4, 68 — 113.
- Catcheside, D. G., 1933b: Chromosome catenation in some F_1 *Oenothera* hybrids. — Journ. Gen., 27.
- Cleland, R. E., 1922: The reduction divisions in the pollen mother cells of *Oenothera franciscana*. — Amer. Journ. Bot., 9, 391—413.
- Cleland, R. E., 1923: Chromosome arrangements during meiosis in certain *Oenotheras*. — Amer. Nat., 57, 562—566.
- Cleland, R. E., 1924: Meiosis in pollen mother cells of *Oenothera franciscana* sulfurea. — Bot. Gaz., 77, 149—170.
- Cleland, R. E., 1925: Chromosome behaviour during meiosis in the pollen mother cells of certain *Oenotheras*. — Amer. Nat., 59, 475—479.
- Cleland, R. E., 1926a: Meiosis in the pollen mother cells of *Oenothera biennis* and *Oe. biennis sulfurea*. — Genetics, 11, 127—162.
- Cleland, R. E., 1926b: Cytological study of meiosis in anthers of *Oenothera muricata*. — Bot. Gaz., 82, 55—70.
- Cleland, R. E., 1928: The genetics of *Oenothera* in relation to chromosome behaviour, with special reference to certain hybrids. — Z. L.

- A. V., Suppl. I, 554—567.
- Cleland, R. E., 1929a: Die Zytologie der *Oenothera*—Gruppe biennis in ihrem Verhältnis zur Vererbungslehre. — Tüb. Naturw. Abh., 12, 50—55.
- Cleland, R. E., 1929b: Chromosome behavior in the pollen mother cells of several strains of *Oenothera Lamarckiana*. — Z. I. A. V., 51, 126—145.
- Cleland, R. E., 1929c: Meiosis in the pollen mother cells of the *Oenotheras* and its probable bearing upon certain genetical problems. — Proc. Intern. Congr. of Plant Sc. Ithaca, 1, 317—331.
- Cleland, R. E., 1932: Further data bearing upon circle formation in *Oenothera*, its cause and its genetical effect. — Genetics, 17, 572—602.
- Cleland, R. E., and Blakeslee, A. F., 1930: Interaction between complexes as evidence for segmental interchange in *Oenothera*. — Proc. Nat. Acad. Sc., 16, 183—189.
- Cleland, R. E. and Oehlkers, F., 1930: Erbllichkeit und Zytologie verschiedener *Oenotheren* und ihrer Kreuzungen. — Jahrb. f. wiss. Bot., 73, 1—124.
- Darlington, C. D., 1929a: Ring-formation in *Oenothera* and other genera. — Journ. Gen., 20, 346—363.
- Darlington, C. D., 1929b: Chromosome behaviour and structural hybridity in the *Tradescantiae*. — Journ. Gen., 21, 207—286.
- Darlington, C. D., 1931: The cytological Theory of Inheritance in *Oenothera*. — Journ. Gen., 24, 406—474.
- Darlington, C. D., 1933: Meiosis in *Agapanthus* and *Kniphofia*. — Cytologia, 4, 229—240.
- Davis, B. M., 1909: Cytological studies on *Oenothera*. — I. Pollen development of *Oenothera-grandiflora*. — Ann. of. Bot., 23, 551—571.
- Davis, B. M., 1910: Cytological studies on *Oenothera*. II. The reduction divisions of *Oenothera biennis*. — Ann. of. Bot., 24, 631—651.
- Davis, B. M., 1911: Cytological studies on *Oenothera*. III. A comparison of the reduction divisions of *Oe. Lamarckiana* and *Oe. gigas*. — Ann. of. Bot., 25, 941—974.
- Davis, B. M., 1933: The genetics and cytology of a tetraploid from *Oe. franciscana*. Bartl. — Genetics, 18, 293—323.
- Dermien, H., 1933: Origin and behaviour of the nucleolus in plants. — Journ. Arn. Arb., 14, 282—323.
- Doutreligne, J., 1933: Chromosomes and nucléoles dans les noyaux du type euchromocentrique. — Cellule, 42, 31—100.
- Emerson, S. H., 1924: The absence of chromosome pairing during meiosis in *Oenothera biennis*. — Pap. Mich. Acad. Sc. and Lett., 4, 111—114.
- Emerson, S. H., 1929: The reduction division in a haploid *Oenothera*. Cellule, 39, 159—165.
- Emerson, S. H., 1931: Parasynapsis and apparent chiasma formation in *Oenothera*. — Amer. Nat., 65, 551—555.
- Emerson, S. H. and Sturtevant, A. H., 1931: Genetical and cytological studies on *Oenothera*. III. — The translocation interpretation. — Z. I. A. V., 59, 395—419.

- Eichhorn, A., 1930: Sur la notion de prochromosomes et des Chromocentres. C. R. Soc. Biol., 104, s. 154.
- Eichhorn, A., 1931: Recherches caryologiques comparées chez les *Angiospermes* et les *Gymnospermes*. — Arch. de Bot., 5, 1—100.
- Eichhorn, A., 1932: Euchromocentres et prochromosomes: leur rapports entre eux et avec la cinèse. — Rev. Gen. Bot., 44.
- Eichhorn, A., 1933: Etat actuel de nos connaissances sur le noyau et sa division chez les végétaux supérieurs. — Bull. d'Hist. Appl., 2, 41—54.
- Erlanson, E. W., 1931: Chromosome organisation in *Rosa*. — Cytologia, 2, 256—282.
- *Gairdner, A. E. and Darlington, C. D., 1931: Ring formation in diploid and polyploid *Campanula persicifolia*. — Genetica, 13, 113—150.
- Gates, R. R., 1908: A study of reduction division in *Oenothera rubrinervis*. — Bot. Gaz., 46, 1—34.
- Gates, R. R. and Goodwin, K. M., 1931: Meiosis in *Oenothera purpurea* and *Oe. blandina*. — Proc. Roy. Soc., B, 109, 150—164.
- Gates, R. R. and Sheffield, F. M. L., 1929: Chromosome linkage in certain *Oenothera hybrids*. — Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B, 217, 367—394.
- Gates, R. R. and Thomas, N., 1914: A cytological study of *Oenothera mut. lata* and *semilata* in relation to mutation. — Quart. Journ. Micr. Sc., 59, 523—571.
- Geerts, J. M., 1907: Über die Zahl der Chromosomen von *Oenothera Lamarckiana*. — Ber. Dtsch. Bot. Ges., 25, 191—195.
- *Geerts, J. M., 1909: Beiträge zur Kenntnis der Zytologie und der partiellen Sterilität von *Oenothera Lamarckiana*. — Rec. Trav. Bot. Neer, 5.
- Geerts, J. M., 1911: Zytologische Untersuchungen einiger Bastarde von *Oenothera gigas*. — Ber. Dtsch. Bot. Ges., 29, 160—166.
- Geitler, L., 1933: Das Verhalten der Chromocentren von *Agapanthus* während der Meiose. — Österr. Bot. Ztschr., 82, 277—282.
- Grégoire, V., 1932: Euchromocentres et chromosomes dans les Végétaux. Bull. Acad. R. Belg., Cl. Sc., 17, 1435—1448.
- Håkansson, A., 1925: Zur Zytologie der Gattung *Godetia*. — Hereditas, 6, 257—274.
- Håkansson, A., 1926: Über das Verhalten der Chromosomen bei der heterotypischen Teilung schwedischer *Oenothera Lamarckiana* und einigen ihrer Mutanten und Bastarde. — Hereditas, 8, 255—304.
- Håkansson, A., 1928: Die Reduktionsteilung in den Samenanlagen einiger *Oenotheren*. — Hereditas, 11, 129—181.
- Håkansson, A., 1929: Chromosomenringe in *Pisum* und ihre mutmassliche genetische Bedeutung. — Hereditas, 12, 1—10.
- Håkansson, A., 1930a: Die Chromosomenreduktion bei einigen Mutanten und Bastarden von *Oenothera Lamarckiana*. — Jahrb. Wiss. Bot., 72, 385—402.
- Håkansson, A., 1930b: Zur Zytologie trisomischer Mutanten aus *Oenothera Lamarckiana*. — Hereditas, 14, 1—32.
- Håkansson, A., 1931: Chromosomenverkettung bei *Godetia* und *Clarkia*. Ber. Dtsch. Bot. Ges., 49, 228—234.

- Hance, R. T., 1918: Variations in the number of somatic chromosomes in *Oe. scintillans* de Vries., Genetics, 3, 225—275.
- Hedayetullah, S., 1932: The genetics and cytology of *Oenothera rubricalyx* $\times$ *Oe. eriensis*. — Journ. Gen., 26, 179—197.
- Hedayetullah, S., 1933: Meiosis in *Oenothera missouriensis*. — Proc. Roy. Soc. B., 113, 57—70.
- Heitz, E., 1929: Heterochromatin, Chromocentren, Chromomeren. — Ber. Dtsch. Bot. Ges., 47, 274—284.
- Heitz, E., 1931a: Nukleolen und Chromosomen in der Gattung *Vicia*. — Planta, 15, 495—505.
- Heitz, E., 1931b: Ursache der gesetzmässigen Zahl, Lage, Form und Grösse pflanzlicher Nukleolen. — Planta, 12, 775—844.
- Heitz, E., 1932: Die Herkunft der Chromocentren. Dritter Beitrag zur Kenntnis der Beziehung zwischen Kernstruktur und qualitativer Verschiedenheit der Chromosomen in ihrer Längsrichtung. — Planta, 18, 571—636.
- Hoar, C. S., 1931: Meiosis in *Hypericum punctatum* Lam., Bot. Gaz., 92, 396—406.
- Hoepfner, E. und Renner, O., 1929: Genetische und zytologische *Oenotherenstudien*. II. — Bot. Abh., 15, 5—86.
- Illick, J. Th., 1929: A cytological study of meiosis in the pollen mother cells of some *Oenotheras*. — Genetics, 14, 591—635.
- Kattermann, G., 1931: Über die Bildung polyvalenter Chromosomenverbände bei einigen Gramineen. — Planta, 12, 732—744.
- Kihara, H., 1927: Über das Verhalten der „end-to-end“ gebundenen Chromosomen von *Rumex acetosella* und *Oenothera biennis* während der heterotypischen Kernteilung. Beitrag zur Frage der Para- und Metasyndese. — Jahrb. f. wiss. Bot., 66, 429—460.
- Koller, P. Ch., 1932: Further studies in *Tradescantia virginiana* var. *humilis* and *Rhoeo discolor*. — Journ. Gen., 26, 81—96.
- Kulkarni, Ch. G., 1929a: Meiosis in pollen mother cells of strains of *Oenothera pratensis* Bartl., Bot. Gaz., 87, 218—259.
- Kulkarni, Ch. G., 1929b: Meiosis in *Oenothera franciscana*. — Pap. Mich. Acad. Sc., 9, 223—226.
- Leliveld, J. A., 1931: Cytological studies in some species of the genus *Oenothera*, Cellule, 40, 193—256.
- Leliveld, J. A., 1932: Cytological observations on the diploid offspring of a haploid *Oenothera franciscana*. — Cellule, 41, 281—289.
- Lewitsky, G. A., 1927: Die Bildung bivalenter Chromosomen in der Gogenese von *Beta vulgaris*. Planta, 3, 100—114.
- Lewitsky, G. A., 1931: The morphology of chromosomes. Bull. of Appl. Bot. of Gen. and Plant Breed., 27, 103—174.
- Lutz, A. M., 1916: *Oenothera* mutants with diminutive chromosomes. Amer. Journ. Bot., 3, 502—526.
- McClintock, B., 1931: A cytological Demonstration of the Location of an Interchange between the non-homologous chromosomes of *Zea Mays*. — Proc. Nat. Acad. Sc., 16, 791—796.
- McClintock, B., 1934: The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea Mays*. — Ztschr. für Zellf. und mikr. Anat., 21, 294—328.

- Meurmann, O., 1929: Association and Types of chromosomes in *Aucuba japonica*. — *Hereditas*, 12, 179—209.
- Michaelis, P., 1930: Über experimentell erzeugte, heteroploide Pflanzen von *Oenothera Hookeri*. — *Ztschr. f. Bot.*, 23, 288—308.
- Miyake, K., 1905: Über Reduktionsteilung einiger Monocotylen. *Jahrb. wiss. Bot.*, 42, 83—116.
- Oelkrug, K., 1934: Genetische und zytologische Untersuchungen an *Eu-Oenotheren*. — *Z. I. A. V.*, 68, 22—93.
- Overeem, C., van, 1922: Über Formen mit abweichender Chromosomenzahl bei *Oenothera*. — *Beih. z. Bot. Zentralblatt*, 39, 1—80.
- Philp and Huskins, C. L., 1931: The cytology of *Matthiola incana* R. Br., especially in relation to the Inheritance of Double Flowers. *Journ. Gen.*, 24, 359—404.
- Rancken, G. 1934: Zytologische Untersuchungen an einigen wirtschaftlich wertvollen Wiesengräsern. — *Acta Agraria Fennica*, 29.
- Renner, O., 1925: Untersuchungen über faktorielle Konstitution einiger komplex heterozygotischer *Oenotheren*. *Bibl. Genetica*, 9, 1—168.
- Rudloff, K. Fr., 1929: Zur Kenntnis der *Oenothera purpurata* Klebahn und *Oenothera rubricaulis* Klebahn. Genetische und zytologische Untersuchungen. — *Z. I. A. V.*, 52, 191—235.
- Sax, K. and Anderson, E., 1934: Interlocking of bivalent chromosomes in *Tradescantia*. — *Genetics*, 19, 157—166.
- Schwemmle J., 1924: Vergleichend zytologische Untersuchungen an *Onagraceen*. — *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, 42, 238—242.
- Schwemmle, J., 1926: Vergleichende zytologische Untersuchungen an *Onagraceen*. II. *Jahrb. wiss. Bot.*, 65, 778—818.
- Schwemmle, J., 1927: Der Bastard *Oenothera Berteriana* $\times$ *Onagra muricata* und seine Zytologie. — *Jahrb. f. wiss. Bot.* 66, 579—595.
- Schwemmle, J., 1928: Genetische und zytologische Untersuchungen an *Eu-Oenotheren*. — *Jahrb. f. wiss. Bot.*, 67, 849—876.
- Schwemmle, J., 1929: Ergebnisse der vergleichend zytologischen Untersuchungen an *Onagraceen*. — *Tüb. Naturw. Abh.*, 12, 42—49.
- Schwemmle, J., 1932: Die Beziehungen zwischen Zytologie und Genetik in der *Oenotherenforschung*. — *Z. I. A. V.*, 61, 36—61.
- Sheffield, F. M. L., 1927: Cytological studies of certain meiotic stages in *Oenothera*. — *Ann. of Bot.*, 41, 779—816.
- Sheffield, F. M. L., 1929: Chromosome linkage in *Oenothera*, with special reference to some F_1 hybrids. — *Proc. Roy. Soc. Lond.*, B, 105, 207—230.
- Sinôto, Y., 1927: Microsporogenesis in *Oe. sinuata* W. — *Bot. Mag. Tokyo*, 41, 225—234.
- Smith, Fr., 1933: Preliminary studies of chromosome rings in *Brodiaea lactea*. — *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 19, 605—609.
- Stomps, Th., J., 1910: Kerndeeling en synapsis bij *Spinacia oleracea*. — *Biol. Zentralbl.* 31, 257—320.
- Valcanover, R., 1926: Contribution à réduction dans l'*Oenothera bienis*. — *Cellule*, 37, 201—227.
- Weier, T. E., 1930: A comparison of the meiotic prophase in *Oenothera Lamarckiana* and *Oenothera Hookeri*. — *Cellule*, 39, 271—305.

Wiśniewska, E., 1932: Entstehung der Chromosomenringe bei *Oenothera*. Zytologische Beobachtungen über die Prophase der Reduktionsteilung bei *Oenothera biennis* und *Oe. Hookeri. velutina vetaurea*. — *Planta*, 18, 211—214.

Prace, zaznaczone *, są mi znane tylko z referatów.

OBJAŚNIENIA TABLIC.

Rys. 1—9 (Tabl. II i III) zostały wykonane przy pomocy obj. apochr. 2 mm. Leitza i okularu komp. 20. Rysowałam na poziomie stołu przy pomocy pryzmatu ryounkowego Zeissa, a następnie rysunki te powiększyłam trzykrotnie, uzyskując powiększenie ca. 11400.

Rys. 10—50 (Tabl. III—V) wykonałam, używając obj. apochr. 2 mm. Leitza, okularu kompensacyjnego 30 i pryzmatu rysunkowego Zeissa ca. 4800.

TABLICA II.

profaza w stożkach wzrostu korzenia.

Rys. 1, 4 i 5: po Hellym i reakcji nuklearnej.

Rys. 2 i 3: po Nawaschinie₂ i fiolecie genejanowym.

TABLICA III.

Rys. 6—8: płytki metafazowe somatyczne; Rys. 6 i 8 po Hellym i reakcji nuklearnej; rys. 7: po Nawaschinie₁ i fiolecie genejanowym.

Rys. 9: chromozomy satelitowe w anafazie somatycznej; po Nawaschinie₁ i fiolecie genejanowym.

Rys. 10: jądro spoczynkowe komórki macierzystej; po Carnoy-Nawaschinie₁ i reakcji nuklearnej.

Rys. 11—13: początki profazy redukcyjnej; po 2BD; rys. 12: po reakcji nuklearnej, rys. 11 i 13: po fiolecie genejanowym.

TABLICA IV.

Rys. 14: zygoten; po Carnoy-Nawaschinie₁ i fiolecie genejanowym.

Rys. 15: pachyten; po Carnoy-Nawaschinie₁ i fiolecie genejanowym.

Rys. 16: części bivalentów diplotenowych; 16a: po Bouin-Allenie i fiolecie genejanowym, 16b po Carnoy-Nawaschinie₁ i fiolecie genejanowym.

Rys. 17: diploten; po 2 BD i reakcji nuklearnej.

Rys. 18: chromozomy satelitowe w diplotenie; po Carnoy-Nawaschinie₁ i fiolecie genejanowym.

Rys. 19: przeplecenie bivalentów w diplotenie; a i b po 2BD i reakcji nuklearnej, c po Carnoy-Nawaschinie₁ i fiolecie genejanowym.

Rys. 20 i 21: późny diploten. Rys. 20 po 2BD i reakcji nuklearnej, rys. 21 po Carnoy-Nawaschinie₁ i fiolecie genejanowym.

Rys. 22—28: diakineza;

Rys. 22: jądro z widocznymi satelitami; po Carnoy-Nawaschinie₁ i fiolecie genejanowym.

Rys. 23: jądro z biwalentem pałeczkowatym; po Carnoy-Nawaschinie₁ i fiolecie gencjanowym.

Rys. 24: przeplecenie dwóch biwalentów; po 2BD i reakcji nuklearnej.

Rys. 25 i 26: biwalenty typu III; rys. 25 po Carnoy-Nawaschinie₁ i fiolecie gencjanowym; rys. 26 po 2BD i reakcji nuklearnej.

Rys. 27: biwalenty typu II (para B); po 2BD i reakcji nuklearnej.

Rys. 28: biwalenty „przyjaderkowe”; po Carnoy-Nawaschinie₁ i fiolecie gencjanowym.

TABLICA V.

Rys. 29: para A w diakinezie; a, b i d po Carnoy-Nawaschinie₁ i fiolecie gencjanowym; c po 2BD i reakcji nuklearnej.

Rys. 30: jądro z pierścieniem czterochromozomowym; po 2BD i reakcji nuklearnej.

Rys. 31: prometafaza; po 2BD i reakcji nuklearnej.

Rys. 32—37: metafaza po Carnoy-Nawaschinie₁ i fiolecie gencjanowym.

Rys. 32: płytka widziana z boku.

Rys. 33, 34 i 35: biwalenty płytek metafazowych, widziane z boku; widoczne są wszystkie wyróżnione typy chromozomów.

Rys. 36: płytka, w której para A występuje w kształcie pierścienia.

Rys. 37: płytka z dwoma pałeczkowatymi biwalentami.

Rys. 38—41: anafaza; po 2BD i reakcji nuklearnej; rys. 38—40: anafaza widziana z boku; rys. 41: płytka anafazowa widziana z góry (stadium późnej anafazy).

Rys. 42—47: kolejne stadia telofazy, po 2BD i fiolecie gencjanowym.

Rys. 48: interkinaza po 2BD i fiolecie gencjanowym.

Rys. 49 i 50: późna telofaza (49) i interkineza (50) po Bouin-Allenie i hematoksylinie.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. In der vorliegenden Arbeit setzte ich mir zum Ziele den Verlauf der Reduktionsteilung so wie die somatische Chromosomengarnitur bei *Oenothera Hookeri* de Vries zwecks Aufklärung folgender Fragen zu untersuchen: a) ob eine morphologische Basis für eine Differenzierung der einzelnen Chromosomen besteht, die es ermöglichen würde, die Gene in den morphologisch charakterisierten Chromosomen zu lokalisieren; b) wie verläuft die Konjugation in einer Art, welche „normale“ Bivalente bildet; c) welchen strukturellen Umständen ist es zuzuschreiben, dass bei *Oenothera* der Austausch zwischen Nichthomologen sehr oft stattfindet, während er bei der Mehrzahl der Gattungen überhaupt nicht oder bloss selten und sporadisch erfolgt.

2. Die Analyse der somatischen Chromosomengarnitur führte ich in den Meristemzellen des Wurzelvegetationskegels

durch, die Beobachtungen über die Reduktionsteilung — in den Pollenmutterzellen. Ausgehend von dem Standpunkte, dass zuerst eine einfache, „normale“ — in zytologischer wie genetischer Hinsicht — Art untersucht werden soll, wählte ich als Untersuchungsobjekt *Oenothera Hookeri*. Bekanntlich gehört diese Art zu den homozygoten Formen und bildet während der Reduktionsteilung 7 Bivalente.

3. Die Kerne von *Oe. Hookeri* gehören zum Typus der chromatinarmen Kerne, die Prochromosomen enthalten. Die Prochromosomen liegen beiderseits der Insertionsstelle: in der Telophase unterliegen sie im Gegensatze zu den übrigen Chromosomen teilen keiner „Dechromatinisation“ (Doutreligne). Die Prochromosomen sind bereits im Ruhekerne längsgespalten.

Während der Mitose und der Meiose kommt es zu einer Differenzierung der Chromosomen, die sich 1) in der Bildung der Chromozentren in der Telophase, 2) in der Entwicklung der Chromosomen in der frühen Prophase und 3) in der ungleichen Kondensation ¹⁾ in der späten Prophase ausdrückt.

4. Dank dem Auftreten der erwähnten Körnchen und eines Satellitenpaares wurde es möglich, einige Chromosomentypen zu unterscheiden, die sonst weder durch ihre Länge, noch durch die Lage der Insertionsstelle voneinander stark abweichen. Die Analyse der Chromosomengarnitur von *Oe. Hookeri* während der Mitose und der Meiose führte zu übereinstimmenden Resultaten, die in folgender Tabelle zusammengestellt wurden:

5. Die Reduktionsteilung verläuft wie folgt: Die Chromosomenkonjugation beginnt bereits auf sehr frühem Stadium der Prophase. Mit dem Beginne der Prophaseveränderungen legen sich die Prochromosome paarweise parallel zueinander an (Parakonjugation). Im Zygotänstadium ist die Parakonjugation sehr deutlich. Die konjugierenden Univalente wickeln sich umeinander. Das doppelte Pachynema zeugt von dem bivalenten Charakter desselben. Im Pachytänstadium sieht man, dass die Enden der Bivalen-

¹⁾ So bezeichne ich die Kontraktion, d. i. die Verkürzung und gleichzeitige Verdickung der Chromosomen, die von einer intensiven Färbung derselben begleitet ist. Da die innere Struktur der Chromosomen unsichtbar ist, vermag ich nicht zu entscheiden, ob die Änderung der Färbung bloss durch die Kontraktion der Chromosomen oder durch die Änderung des chemischen Zustandes derselben hervorgerufen wird, d. i. mechanisch oder chemisch bedingt ist.

Somatische Chromosomen	Chromosomentypen.	Chromosomen in Reduktionsteilungbegriffen
Mittlere Prophase.	I: Paar A. Insertionsstelle subterminal; auf dem kürzeren, überall stark kondensierten Schenkel grosse Satelliten; am Ende des längeren Schenkels ein stark kondensiertes Körnchen. II: Paar B: etwas grösser als die übrigen Paare; Insertionsstelle submedian; an beiden Schenkeln stark kondensierte Körnchen an den Enden. III: Paare C,D,E und F: Insertionsstelle median; auf einem Schenkel am Ende ein stark kondensiertes Körnchen. IV: Paar G: Insertionsstelle median; kondensierte Körnchen fehlen.	Diplotän und Diakinese.
Prometaphase, Metaphase.	Stark kondensierte Körnchen unsichtbar.	Prometaphase.
Anaphase.	Stark kondensierte Körnchen sichtbar. Chromosomentypen wie oben.	Metaphase.

te frei sind — sie bilden mithin kein Offenspirem. Im Diplotän sind die Univalente umeinander gewickelt und an manchen Kreuzungspunkten bilden sich Chiasmen.

In der Diakinese nehmen die Bivalente infolge der Lockerung und der Chiasmenterminalisation eine ringförmige Gestalt an. In 50% der Kerne tritt Interlocking ein. In einem Kerne — auf einige Hundert untersuchte — wurde ein Ring aus vier Chromosomen beobachtet; dieser Umstand beweist, dass bei homozygoten Formen ein Austausch zwischen Nichthomologen möglich sei (Vgl. die Unters. von Cleland, 1932).

In der Prometaphase verschwindet die Kernmembran sowie der Nukleolus und es bildet sich eine multipolare Spindel, die später bipolar wird. In der Prometaphase erreicht der Kondensationsprozess, der bereits in der frühen Prophase begonnen hat, seine maximale Intensität. Die Bivalente sammeln sich in der Zelle, wobei das Satellitenpaar meistens eine Verspätung erfährt.

In der Metaphase treten ausnahmsweise unterterminalisierte Chiasmen auf. Das Interlocking hält an.

Die Anaphase verläuft regelmässig, die Bivalente weichen ungefähr gleichzeitig auseinander.

In der Telophase wird die Trennung der Chromosomen sichtbar. Die Chromatiden bleiben bloss an der Insertionsstelle verbunden, so dass die Chromosomen jetzt eine kreuzförmige Gestalt annehmen.

6. Die Kernkörperchen entstehen in der Reduktionstelo- phase aus einer formlosen Substanz, die sich auf den Chromoso- men sammelt und später in Kugelform ausgeschieden wird. Die einzelnen Kugeln verschmelzen miteinander zu einigen grösseren bzw. zu einem grossen Kernkörperchen. In der somatischen Telo- phase ist die Zahl der gebildeten Kernkörperchen ebenfalls grösser als die Anzahl der Satellitenchromosomen. In der somatischen Prophase jedoch liegen die Satelliten gewöhnlich auf der Oberflä- che des Nukleolus, so dass zwischen den Kernkörperchen und den Satellitenchromosomen anscheinend irgendein näher noch unbe- kannter Zusammenhang besteht.

7. Ein Vergleich zwischen *Oe. Hookeri* und anderen ring- bildenden Gattungen macht es wahrscheinlich, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen der Ringbildung und dem Kerntypus be- steht. Diese Vermutung wird durch folgende Tatsachen bekräftigt:

a) Innerhalb einiger Gattungen, wie z. B. *Oenothera*, findet ein Austausch zwischen Niehthomologen bei mehreren Arten so- wie bei einer einzigen oft statt: in allen derartigen Arten bilden sich grosse Ringe. Innerhalb anderer Gattungen, wie z. B. bei *Rosa*, kommt ein derartiger Austausch selten vor und daher treten auch Ringe nur bei manchen Arten auf und erreichen in keinem Falle eine beträchtlichere Grösse. In der Mehrzahl der Gattun- gen werden Ringe überhaupt nicht gebildet. Da die Arten einer Gattung dem gleichen karyologischen Typus angehören, liegt die Vermutung nahe, dass zwischen der Ringbildung und dem Kern- typus irgendwelche Zusammenhänge bestehen.

b) Der Austausch zwischen den Niehthomologen hängt un- zweifelhaft davon ab, ob die Chromosomen leicht zerfallen und ob die dabei entstandenen Teile leicht miteinander sich verbinden; dieser Umstand wieder ist notwendigerweise durch die Struktur des Kernes und der Chromosomen bedingt und mag in der ver- schiedenen Struktur der einzelnen Chromosomenteile begründet sein. Diese Vermutung wird durch die Beobachtungen an *Oeno- thera* vollauf bestätigt. Einige Autoren wiesen bereits auf die ungleiche Kondensation der Chromosomen hin; bei *Oe. Hookeri*

konnte ich nicht nur einen Unterschied zwischen Kondensation der Mittelteile der Chromosomen und derjenigen der Schenkel feststellen, sondern sogar an den Chromosomenenden selbst einen ähnlichen Unterschied zwischen den schwach kondensierten Schenkeln und den an ihren Enden liegenden stark kondensierten Körnchen konstatieren.

Von den Chromosomenringe bildenden Pflanzen ist *Zea Mays* gründlicher untersucht worden. Auch bei dieser Art sind die Chromosomen in ihrem Baue differenziert („Knobs“, Satelliten und „nucleolar organizing body“).

Immerhin darf hervorgehoben werden, dass Chromosomenringe in Kernen auftreten können, die strukturell sehr weit voneinander abweichen (z. B.: *Pisum*, *Tradescantia* und *Oenothera*).

Herrn Professor Cleland möchte ich auch an dieser Stelle meinen herzlichsten Dank aussprechen für die liebenswürdige Zusendung der Samen von *Oe. Hookeri*.

Institut für Allgemeine Botanik der Universität Warszawa.

TAFELNERKLÄRUNG.

Optik: Fig. 1—9: Leitz Apochr. 2 mm., Okul. Komp. 20 ×, Vergr. ca. 114000.

Fig. 10—50: Leitz Apochr. 2 mm., Okul. Komp. 30 ×, Vergr. ca. 4800.

TAFEL II.

Prophase in Wurzelmeristemzellen; Fig. 1 — 5: nach Helly und Nuklearreaktion; Fig. 2 und 3: nach Nawaschin₂ und Gentianaviolett.

TAFEL III.

Fig. 6—8: somatische Äquatorialzellen; Fig. 6 und 8 nach Helly und Nuklearreaktion; Fig. 7: nach Nawaschin₁ und Gentianaviolett.

Fig. 9: Satellitenchromosomen in der somatischen Anaphase; nach Nawaschin₁ und Gentianaviolett.

Fio. 10: Ruhekern einer Pollenmutterzelle; nach Carnoy-Nawaschin₁ und Nuklearreaktion.

Fig. 11—13: Beginn der Reduktionsteilung; aufeinanderfolgende Stadien der frühesten Prophase; nach 2 BD (La Cour); Fig. 11 und 13: nach Gentianaviolett; Fig. 12: nach Nuklearreaktion.

TAFEL IV.

Fig. 14: Zygotänstadium; nach Carnoy-Nawaschin₁ und Gentianaviolett.

Fig. 15: Pachytänstadium; nach Carnoy-Nawaschin₁ und Gentianaviolett.

Fig. 16: Teile der Diplotänbivalente; a: nach Bouin-Allen, b: nach Carnoy-Nawaschin₁, beide nach Gentianaviolett.

Fig. 17: Diplotänstadium; nach 2 BD und Nuklearreaktion.

Fig. 18: Satellitenchromosomen in Diplotänstadium (Satelliten ausnahmsweise sichtbar); nach Carnoy-Nawaschin₁ und Gentianaviolett.

Fig. 19: Interlocking der Bivalente in Diplotänstadium; a und b nach 2 BD und Nuklearreaktion; c nach Carnoy-Nawaschin₁ und Gentianaviolett.

Fig. 20 und 21: Spätes Diplotänstadium; Fig. 20 nach 2 BD und Nuklearreaktion; Fig. 21: nach Carnoy-Nawaschin₁ und Gentianaviolett.

Fig. 22—28: Diakinese.

Fig. 22: Kern mit ausnahmsweise sichtbaren Satelliten; nach Carnoy-Nawaschin₁ und Gentianaviolett.

Fig. 23: Kern mit einem Rodbivalent; nach Carnoy-Nawaschin₁ und Gentianaviolett.

Fig. 24: Kern mit zwei interlockten Bivalenten; nach 2 BD und Nuklearreaktion.

Fig. 25 und 26: Bivalente von Typus III; Fig. 25: nach Carnoy-Nawaschin₁ und Gentianaviolett; Fig. 26: nach 2 BD und Nuklearreaktion.

Fig. 27: Bivalente von Typus II; nach 2 BD und Nuklearreaktion.

Fig. 28: an der Oberfläche des Nukleolus liegende Bivalente; nach Carnoy-Nawaschin₁ und Gentianaviolett.

TAFEL V.

Fig. 29: Paar A in der Diakinese; a, b und d: nach Carnoy-Nawaschin₁ und Gentianaviolett; c nach 2 BD und Nuklearreaktion.

Fig. 30: Diakinesekern mit einem Viererring; nach 2 BD und Nuklearreaktion.

Fig. 31: Prometaphase; nach 2 BD und Nuklearreaktion.

Fig. 32—37: Metaphase; nach Carnoy-Nawaschin₁ und Gentianaviolett.

Fig. 32: Äquatorialplatte von Seite gesehen.

Fig. 33, 34 und 35: Bivalente von drei Äquatorialplatten, in welchen alle vier Typen von Chromosomen sichtbar sind.

Fig. 36: Bivalente von einer Äquatorialplatte, in welcher Paar A ausnahmsweise ein Ring bildet.

Fig. 37: Bivalente von einer Äquatorialplatte, in welcher ausnahmsweise zwei Rodbivalente vorhanden sind.

Fig. 38—41: Anaphase; nach 2 BD und Nuklearreaktion; Fig. 38—40: Anaphaseplatten von Seite gesehen; Fig. 41: Anaphaseplatte von oben gesehen (späte Anaphase).

Fig. 42—47: aufeinanderfolgende Telophasestadien; nach 2 BD und Gentianaviolett.

Fig. 48: Interkinese; nach 2 BD und Gentianaviolett.

Fig. 49: späte Telophase; nach Bouin-Allen und Hämatoxylin.

Fig. 50: Interkinese; nach Bouin-Allen und Hämatoxylin.

G. FLANCERÓWNA.

z Zakładu Fizjologii Roślin U. J. P.

BADANIA NAD NATURĄ AMYLAZY SŁODOWEJ.

(Untersuchungen über die Natur der Malzamylase).

(Wpłynęło 28.VI.1935).

Chemja enzymów jest zagadnieniem żywo interesującym badaczy nieomal tak dawno, jak dawno znane są te czynniki. O jakichś badaniach nad strukturą chemiczną enzymów, może być przedewszystkiem mowa tylko u tych spośród nich, które bądź to występują w formie t. zw. ektoenzymów, to jest są wydzielane przez komórki lub narządy wydzielnicze ustroju nazewnątrz, względnie u tych, które mogą w stosunkowo prosty sposób sztuczny (przez wyciskanie, ekstrahowanie rozmaitemi rozpuszczalnikami i t. p.), ulec oddzieleniu od struktury komórkowej.

Ale i w tych wypadkach napotyka się na znaczne trudności. Enzym, otrzymany w jakikolwiek z wyżej podanych sposobów, występuje zawsze łącznie z całym szeregiem rozmaitych pod względem chemicznym ciał, które zostały usunięte z komórki wraz z badanym enzymem. Przytem najczęściej z niektórymi spośród nich enzym jest ściśle związany, czyto przez powinowactwo chemiczne, czy też przez jakąś formę adsorbeji.

Trudność w tym punkcie polega na oddzieleniu enzymu od tych ciał towarzyszących i na stwierdzeniu, którym z nich przypisać rolę składowej części enzymu, a które uważać jedynie za przypadkową, lub przy wyodrębnianiu nieoddzieloną od enzymu domieszkę.

Nic więc dziwnego, że w kwestji charakteru chemicznego enzymów wogóle, a amylazy w szczególności, nie było i niema dotychczas jednolitego poglądu. Wszyscy dawni badacze stali na

stanowisku, że enzymy, a więc i amylaza, stanowią ciała białkowe z domieszką innych jeszcze ciał, głównie o charakterze węglowodanów. Przez nowszych badaczy hipoteza ta uważana była jednak za błędną. Białko wykrywane w preparatach enzymatycznych, przypisywali oni nie enzymowi, a substancjom towarzyszącym, wyodrębnionym wraz z enzymem z materiału wyjściowego.

Zdawało się, że sprawa ta została definitywnie rozwiązana przez badania Willstaettera i jego szkoły. Udało im się mianowicie, przez zastosowanie adsorbentów o różnej zdolności adsorbencyjnej w stosunku do enzymu i substancji mu towarzyszącej, otrzymać szereg enzymów w postaci preparatów niewykazujących żadnej z ogólnie stosowanych, charakterystycznych reakcyj na białko, a więc według nich pozbawionych białka. Tak więc otrzymali sakcharazę, lipazę, trypsynę, amylazę trzustkową, jako substancje całkowicie wolne od białka i węglowodanów.

Niestety jednak badania Willstaettera, przyjęte pierwotnie przez cały świat naukowy, jako pewnik nie podlegający żadnej już dyskusji, wywołały w ostatnich latach z różnych stron szereg sprzeciwów, opartych na nowych doświadczeniach w tym kierunku, wyniki których są sprzeczne z wynikami szkoły Willstaettera.

Stara więc i już zaczynająca przechodzić w zapomnienie kwestja charakteru białkowego enzymów, znów stała się aktualną. I znów stoimy przed dawnym zagadnieniem: czy enzymy są proteinami, czy też niemi nie są.

HISTORIA.

Jak już wspomniano dawni badacze wszyscy, niezależnie od tego jakie stosowali metody, otrzymywali rezultaty, świadczące, że amylaza jest substancją białkową.

Osborne i Campbell (13, 14) przez stosowanie wyśalania — wytrącania enzymu siarczanem amonu, otrzymywali ze słodu substancję enzymatycznie bardzo czynną, zawierającą około 17% azotu. Uważali ją za mieszaninę albuminy (leukozyny) z peptonem lub proteozą.

Z tego samego mniej więcej okresu są badania A. Wróblewskiego (23). Autor stosował do oczyszczania enzymu (diastaza ze słodu) podwójną technikę. Najprzód wyciągał słabym alkoholem i z tego roztworu strącał enzym alkoholem o wyższej koncentracji. Osad rozpuszczony w wodzie był czynny, ale zawie-

rał białko i węglowodan, określony przez niego jako araban. Dla dalszego oczyszczenia tego preparatu stosował frakcjonowane wysalanie siarczanem amonu (24). Z trzech frakcyj otrzymanych w ten sposób, przez zastosowanie 50%-wego siarczanu amonu, 60%-wego i nasyconego, pierwsza zawierała tylko amylazę, druga amylazę i araban, trzecia tylko araban.

Pierwsza frakcja dawała wyraźną reakcję z odczynnikami Millona, ksantoproteinową i biuretową, zawierała 16,5% azotu i wykazywała cechy chemiczne właściwe ciałom o charakterze albumin. Co do znaczenia arabanu autor sam wyraźnie się nie wypowiada za jego przynależnością do enzymu, przypuszcza, iż nie ma on żadnego znaczenia przy rozkładzie skrobi przez amylazę.

Dużo później do takich samych wyników, niezależnie od Wróblewskiego, nie wiedząc nawet o jego doświadczeniach, doszedł B i e d e r m a n n (1). Pracował on nad amylazą ślinową — ptyaliną. Otrzymywał ją przez strącanie alkoholem i rozpuszczanie otrzymanego osadu w 0,5% chlorku sodu. Przez zastosowanie kilkakrotnego strącania i rozpuszczania w powyższy sposób, doszedł do substancji, która w swoich własnościach chemicznych wykazywała cechy charakterystyczne dla albumoz.

Wnioskuje stąd, że amylaza ślinowa stoi w ścisłym związku z albumozą występującą obok mucyny i białek właściwych w ślinie. Nazwał on ją „Speichelalbumose”. Stanowi ona substancję wykazującą cechy wspólne białkom właściwym i albumozom. Stwierdził, że siła diastyczna śliny jest wprost proporcjonalna do ilości tej substancji w niej zawartej, a strącalnej przez alkohol i rozpuszczalnej w chlorku sodu.

Podobną substancję autor znalazł również w słodzie. Otrzymanie jej jednak ze słodu, przedstawia znacznie większe trudności, ze względu na daleko bogatszy skład jakościowy słodu w porównaniu ze śliną. Przy otrzymywaniu tej substancji ze słodu zapomocą strącania alkoholem, strąca się jednocześnie bardzo wiele innych ciał o charakterze gum, węglowodanów i t. p.

Na tej podstawie autor wnioskuje, że wszędzie gdzie występuje funkcja diastatyczna, jest ona związana z ciałami o charakterze albumoz i wobec tego należy uważać te ostatnie za organiczny składnik kompleksu „amylaza”. Podobnie zresztą do Wróblewskiego znalazł w preparatach z wyciągu słodowego i „maltyny” Mereka węglowodan, który jednak uważa, tak samo jak Wróblewski, za domieszkę tylko, pozbawioną znaczenia dla funkcji diastycznej.

Zbliżone stanowisko zajmuje Sherman (17—22) i jego szkoła. Opowiadają się oni wprost za poglądami Osborna. W szeregu licznych doświadczeń, trwających od r. 1911 do chwili obecnej, głównie nad amylazą trzustkową, a częściowo i nad ślinową i słodową, stale stoją na stanowisku, że enzym ten jest substancją białkową. W ciągu tego długiego okresu czasu niejednokrotnie zmieniali metodę oczyszczania enzymu, dochodząc do preparatów o wysokim stopniu jednolitości chemicznej i czynności enzymatycznej, nigdy jednak nie udało im się otrzymać substancji czynnej enzymatycznie a pozbawionej charakteru proteinowego. Zasadnicza metoda (17) przez nich stosowana, polegała na wyciąganiu diastazy 50 % -wym alkoholem etylowym i wytrącaniu z tego roztworu enzymu mieszaniną alkoholu i eteru. Zakładali więc, że kompleks białkowo-enzymatyczny ma charakter protein. rozpuszczalnych w 50 % -wym alkoholu etylowym. Osad otrzymany tą drogą podlegał rozpuszczeniu w małej ilości wody i ponownemu strąceniu pięciokrotną ilością alkoholu absolutnego. Otrzymany osad rozpuszczali wreszcie w 50 % -wym alkoholu i poddawali dializie. Podczas dializy ilość białka wydatnie się zmniejszała. Po dializie ponownie strącali enzym mieszaniną alkoholu i eteru. Proces ten powtarzali kilkakrotnie, modyfikując w różny sposób koncentrację alkoholu i czas dializy. W każdym jednak wypadku produkt otrzymany, o znacznie zwiększonej w porównaniu z wyjściowym sile enzymatycznej, wykazywał charakter białek. Analiza elementarna dała w jednym z wypadków następujące cyfry:

C%	H%	N%	O
52,8	6,7	15,5	25,0

Analiza powyższa wskazuje na charakter proteinowy tych substancji. W jednej z następnych prac (18) nad amylazą trzustkową, autorzy dokonali dokładniejszej analizy otrzymanego preparatu.

Wynik otrzymali następujący:

w %-ach	C	H	N	S	P	O i reszta
	51,9	6,6	15,3	1,0	0,8	24,4

Z analizy wynika wielkie podobieństwo tego ciała do kazeiny i albuminy.

Przy ogrzewaniu w 70° C. produkt rozpuszczony w wodzie daje koagulat, przesącz zawiera proteiny i peptony. Autorzy wnio-

skuja stąd, że enzym tworzy się z jakiegoś białka preformowanego (preexistent) przez procesy hydrolizy, związane być może z jakimiś procesami utleniającymi.

W roku 1915 zostały przez Shermana opublikowane 2 prace nad amylazą słodową (19, 20). Wyniki jej są zgodne z wynikami dla amylazy trzustkowej. Preparaty otrzymane, o dużym stopniu czystości i aktywności enzymatycznej, stale zawierały około 15% azotu i zachowywały się, podobnie jak poprzednie, jak albuminy.

Z porównania preparatów amylazy trzustkowej i słodowej wynika, że obie one stanowią substancje zbliżone, ale różniące się pod niektórymi względami. Obie są to bezpostaciowe substancje azotowe, rozpuszczalne w wodzie i 50%-wym alkoholu, a nierozpuszczalne w alkoholu stężonym i acetonie. Obie wykazują reakcje ksantoproteinową, biuretową, Millona i ninhydrynową, Obie zawierają 15—16% azotu i przy analizie v. Slyke'a dają ośm charakterystycznych form związków azotowych, w stosunku takim, w jakim substancje te występują w kazeinie, edestynie lub hemoglobinie. Obie przy ogrzewaniu dają koagulat albuminowy i proteozę względnie pepton. Różnica polega na różnym optimum pH i na różnej sile diastatycznej. Zasadniczo amylaza trzustkowa jest znacznie aktywniejsza niż słodowa. Pozatem preparaty amylazy trzustkowej mają zdolność hydrolizowania obok skrobi także białek: kazeiny i żelatyny, zdolności tej preparaty amylazy słodowej nie wykazują.

W ostatnich latach, już po całym szeregu prac szkoły Willstaettera, wyniki których całkowicie przeoczyły hipotezie o charakterze białkowym enzymu diastatycznego, Sherman (21) wspólnie z swoimi współpracownikami zastosował również adsorbcję jako metodę oczyszczania tych substancyj.

Po wstępnych próbach zastosowali metodę następującą: adsorbcja odbywała się przy pH 5,2—6,0 w obecności 25% alkoholu i przy zastosowaniu 0,6—0,8 gr Al_2O_3 na każde 100 ccm wyciągu enzymatycznego. Do readsorbcji stosowali rozcieńczony ług sodowy. Z readsorbentu wytrącali enzym mieszaniną eteru i alkoholu. Preparat otrzymany wykazywał siłę enzymatyczną wyrażoną liczbą 3760 (wyjściowa pankreatyna — 512). Tak dużego stopnia oczyszczenia bez stosowania adsorbcji nie otrzymywali nigdy.

Charakter chemiczny uzyskanego preparatu nie różnił się jednak od poprzednich. Wykazywał on taką samą zawartość azotu i tak samo jak poprzednie, wykazywał własności chemiczne właściwe albuminom.

Zastosowanie powtórnej adsorpcji nie zmieniło w niczem własności chemicznych otrzymanego ciała.

Również ostatnia praca tego autora (22) nad amylazą słodową przeczy wynikom szkoły Willstaettera.

Stosując nową metodę, opartą na frakcjonowaniu wysalaniu enzymu siarczanem amonu, rozpuszczaniu otrzymanego osadu w wodzie i ponownem, frakcjonowaniem wytrącaniu alkoholem etylowym o różnej koncentracji, — otrzymali preparaty amylazy słodowej o bardzo wysokim stopniu aktywności enzymatycznej.

Otrzymany produkt zawierał 16% azotu, wykazywał wszystkie reakcje charakterystyczne dla białek i tak samo jak te ostatnie, ulegał strącaniu i denaturacji połączonym z jednoczesną utratą funkcji enzymatycznej.

Również Luers i Sellner (9, 10, 11) pracowali nad amylazą słodową, stosując technikę oczyszczania enzymu przez adsorpcję, ściśle według Willstaettera. Po zastosowaniu dwukrotnej adsorpcji i następnej elucji otrzymali produkt o 25—30-krotnie zwiększonej sile enzymatycznej. Dalsza adsorpcja nie zmieniała już stopnia czystości enzymu. Otrzymany preparat wykazywał następującą zawartość białka i węglowodanów:

	Białka	Węglowodany
Materiał wyjściowy w %-ach	42.99	74.4
„ otrzymany „	43.56	28.07

Proces oczyszczania przez adsorpcję według Willstaettera prowadzi więc do usunięcia węglowodanów, a nie białek.

Analiza metodą v. Slyke'a dała ten sam rezultat co u Shermana. Pomimo więc siedmiokrotnie większego stopnia oczyszczenia niż u Shermana, skład chemiczny pozostał ten sam. Autorzy jednak nie wnioskuja stąd, iż białko jest istotnym składnikiem enzymu, przypuszczają natomiast, iż usunięcie białek jest tylko kwestją zastosowania jeszcze bardziej celowej metody, niż nią jest metoda adsorpcyjna Willstaettera.

Zupełnie odmienne dane co do charakteru chemicznego amylazy wynikają z doświadczeń szkoły Willstaettera. Pracowali oni głównie nad amylazą trzustkową, mniej nad słodową. Przez wykorzystanie różnej zdolności adsorpcyjnej trzech enzymów zawartych w soku trzustkowym (lipazy, tripsyny i amylazy), udało im się oddzielić te enzymy od siebie i poddać je potem dalszemu procesowi oczyszczania.

Willstaetter, Waldschmidt-Leitz i Hesse (26, 27, 28) adsorbowali lipazę z kwaśnego roztworu na wodortlenku glinu, z pozostałości adsorbowali trypsynę na kaolinie w roztworze również kwaśnym. Pozostawała w ten sposób amylaza wolna od lipazy i trypsyny. Już jednak ten przedwstępny proces związany jest ze znacznymi stratami w samej ilości amylazy, gdyż za każdym razem ulegała i ona wprawdzie nieswoistej, ale jednak częściowej adsorpcji.

W tym stanie amylaza adsorbuje się już bardzo trudno, i to tylko z roztworu zawierającego 50% alkoholu. W rezultacie autorzy otrzymali preparaty amylazy 130 razy silniejsze niż gruczoł wyjściowy, 70 razy silniejsze niż otrzymane przez Euler'a i Svanberg'a (3) i 10 razy silniejsze niż najczystsze preparaty Shermana. Preparaty te nie dawały żadnej z reakcyj charakterystycznych dla białek ani węglowodanów, z wyjątkiem słabej reakcji dodatniej z odczynnikiem Molischa. Autorzy stoją wobec tego na stanowisku, że amylaza, tak samo zresztą jak inne enzymy, nie jest substancją białkową. Białko stanowi jedynie substancję towarzyszącą enzymowi (Nebenprodukt), taksamo jak są niemi liczne inne substancje o innym charakterze, jak np. węglowodany. Różnica polegałaby jedynie na tem, że enzym jest bez porównania silniej związany z białkiem, aniżeli z innymi substancjami towarzyszącymi.

Enzym według Willstaettera (29) składa się z koloidalnego podłoża (Träger) i z właściwej enzymatycznie czynnej grupy. Usunięcie podłoża koloidalnego nie powinno wpłynąć na czynność samego enzymu. O charakterze chemicznym koloidalnego podłoża autor nic bliższego nie podaje.

Również Fricke i Kaja (7, 8) otrzymywali z „Diastase absolut” Merck'a, przez zastosowanie elektroosmozy i elektrodializy, preparaty niewykazujące żadnej reakcji białkowej. Preparaty te były bardzo ubogie w popiół (mniej niż 0,05%), zawierały mało azotu (około 4%), natomiast bogate były w węglowodany — dawały wyraźną reakcję z odczynnikiem Molischa.

Cheąc lepiej zrozumieć tę rozbieżność w wynikach poszczególnych autorów, należy uwzględnić kilka czynników wpływających na to. Przedewszystkiem operowali oni niejednakowym materiałem doświadczalnym. Skład chemiczny otrzymanych przez nich preparatów w dużym stopniu był zależny od materiału wyjściowego, od jego mniej lub więcej skomplikowanego składu. Tak np. w pracach nad amylazą trzustkową, względnie ślinową, łatwiej

jest osiągnąć stosunkowo czyste substancje, niż przy operowaniu tak bardzo złożonem chemicznie ciałem, jakim jest nprz. wyciąg z ziarn jęczmienia. Drugi czynnik to stosowanie niejednakowych kryterjów dla rozstrzygnięcia sprawy charakteru chemicznego otrzymanego ciała. Jedni chorzy, jak Sherman i inni, stosowali całkowitą analizę elementarną i na podstawie stosunku ilościowego poszczególnych pierwiastków, wchodzących w skład badanego preparatu enzymatycznego, wnioskowali o jego przynależności, lub nieprzynależności do substancyj białkowych.

Inni poprzestawali na stosowaniu zazwyczaj używanych prób jakościowych do wykrycia białka, a więc używali w tym celu odczynnika Millona, kwasu pikrynowego, kwasu azotowego i t. p.

Pierwszy z wymienionych sposobów, mianowicie analiza elementarna, daje wyniki daleko pewniejsze niż drugi.

Jeśli bowiem chodzi o stosowanie odcz. Millona, Essbacha (kwas pikrynowy) i t. p., to wyniki otrzymane z ich pomocą są zależne przede wszystkim od ilości materiału wziętego do próby, a pozatem od tego, z jaką grupą białek mamy do czynienia.

Niestety rzadko autorzy podają z jakimi ilościami wagowymi otrzymanych preparatów pracowali. Wynik ujemny reakcji białkowej zależy nie tylko od braku tej substancji, ale również od tego, czy ilość jej nie leżała poniżej granicy wykrywalności przez dany odczynnik.

Z drugiej strony brak reakcji dodatniej z danym odczynnikiem, może być spowodowany brakiem w badanej substancji pewnego określonego składnika, reagującego na stosowany odczynnik. Tak nprz. odczynnik Millona reaguje jedynie z tyrozyną występującą w drobinie białkowej, — białko pozbawione tyrozyny da z odczynnikiem Millona reakcję ujemną, stąd prosty, ale niesłuszny wniosek, że substancja badana nie posiada charakteru białkowego.

Dla zilustrowania tego podajemy, wykonane z albuminą jaja kurzego, próby na czułość zazwyczaj stosowanych odczynników, służących do wykrycia substancyj białkowych.

białko mg w 1 cm ³	odeczyn. Millona	odeczyn. Essbacha	kwas azotowy
10	++++	++++	++++
1	++	++	+
0,1	+	+	±
0,05	±	±	—
0,02	—	—	—
0,01	—	—	—

Widać stąd, że już przy ilości wynoszącej 0,1 mg albuminy w 1 ccm reakcja ksantoproteinowa nie daje pewnego wyniku, wynik pewny daje natomiast odczynnik Millona i kwas pikrynowy. Mniejszych od powyższej ilości już żadnym odczynnikiem wykryć nie można — reakcja ksantoproteinowa wypada ujemnie, odczynnik Millona i kwas pikrynowy dają wyniki wątpliwe.

Jeśli uwzględnimy ten czynnik, to wnioski autorów co do charakteru proteinowego, względnie nieproteinowego badanego enzymu, na podstawie jedynie prób z wymienionymi odczynnikami, bez podania ilości substancji badanej wziętej do próby, nie mogą być uważane za całkowicie pewne.

Pewne natomiast są wnioski oparte na analizie elementarnej otrzymanego preparatu enzymatycznego; w takim wypadku stosunek pierwiastków rzuca jasne światło na jego charakter chemiczny.

Z drugiej strony spotkać się można z poglądem, że amylaza nie tylko nie jest białkiem, ale nie jest nawet substancją koloidalną.

I tak F r a e n k e l i H a m b u r g (6) przez zastosowanie kombinowanego oczyszczania składającego się z:

1) oczyszczania chemicznego, polegającego na strącaniu rozcieńczonym octanem ołowiu,

2) mechanicznego, przez sączenie przez filtry Pukalla,

3) biologicznego, polegającego na fermentacji węglowodanów zapomocą rasy drożdży Froberg,

otrzymywali enzym w postaci proszku całkowicie pozbawionego węglowodanów i niewykazującego żadnej reakcji na białko. Preparat otrzymany prawie nie wykazywał cech koloidu i tak npr., nie podlegał adsorbcji przez koloidy nieorganiczne, niezależnie od tego jaki był ładunek elektryczny użytego adsorbentu i odczyn środowiska w jakim się adsorbēja odbywała, pozatem przechodził przez ultrafiltry, nie wykazywał zjawiska kataforezy nawet pod wpływem silnego prądu elektrycznego i t. p. Jedynie zachowanie się jego pod ultramikroskopem dowodziło, że jest on koloidem o bardzo małej wielkości cząstek. Praca powyższych autorów była kontynuowana przez E. P r i b r a m a (16). Stosował on metodę podobną do poprzedniej, przyczem główny nacisk kładł na stronę biologiczną procesu oczyszczania. Enzym oczyszczony drogą biologiczną ulegał jeszcze potem dializie lub sączeniu przez ultrafiltry. Substancja enzymatycznie czynna otrzymana przez autora, okazała się jednak ciałem koloidalnem, o bardzo wysokim stopniu roz-

proszenia. Składa się ona z dwóch głównych składników: pierwszy stanowi ciało o charakterze polipeptydu, składającego się z niewielu aminokwasów i zawierającego 6—8% azotu. Drugie jest to substancja węglowodanowa, stanowiąca prawdopodobnie spolimerizowany kwas węglowodanowy.

WŁASNE BADANIA.

W pracy niniejszej starano się przez zastosowanie metod własnych i dotychczas przez innych badaczy stosowanych, stwierdzić, czy możliwym jest oddzielić funkcję enzymatyczną badanego materiału od jego struktury białkowej.

Dla oczyszczenia enzymu stosowano następujące metody:

- 1) dializę,
- 2) frakcjonowane wyciąganie enzymu ze słodu,
- 3) frakcjonowane strącanie białek przy różnym pH,
- 4) adsorbcję.

1. DIALIZA.

Materiał wyjściowy stanowił słód jęczmienny browaru Harberbusch i Schiele. Słód zmielony zalewano wodą destylowaną w stosunku 3 gr. wody na 1 gr. słodu, skłócano dokładnie z 1% toluenu i zostawiano, często skłócając, na 24 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie wyciskano przez płótno i mętny wyciąg sączono przez bibułę, aż do otrzymania klarowanego płynu. Wyciąg taki zawierał zawsze znaczne ilości białek i węglowodanów.

Wyciąg w ten sposób otrzymany poddawano dializie w woreczkach kolodjowych wobec wody destylowanej. Sposób przeprowadzania dializy został opisany w poprzedniej pracy (4).

Podczas dializy wytrącał się zawsze po krótszym lub dłuższym czasie — zwykle wtedy, gdy zawartość składników mineralnych w płynie dializowanym znacznie spadała, brunatny, lepki osad. Bliższe badanie wykazało, że osad ten w głównej mierze stanowi białko. Jest on nierozpuszczalny w wodzie, rozpuszcza się natomiast prawie całkowicie w kwasie solnym i w norm. chlorku sodu. Roztwór jego w chlorku sodu wykazuje wszystkie reakcje charakterystyczne dla białek a więc: ksantoproteinową, Millona.

strąca się przez kwas pikrynowy. W pierwszym przybliżeniu można go uważać za globuliny ziarna jęczmiennego.

Co do samej dializy, to dało się stwierdzić, iż nawet najdłużej prowadzona dializa nie daje w rezultacie płynu całkowicie pozbawionego składników mineralnych i białek, choć ilość ich znacznie spada. Wyciągi dializowane wykazują zawsze dość znaczną zawartość substancyj białkowych, nawet wyciągi bardzo słabo enzymatycznie czynne zawsze białko zawierają. Z drugiej strony w każdym wypadku, gdy zaobserwowano przechodzenie przez woreczek dializacyjny białka, szło z tem równolegle przechodzenie enzymu. Ogólnie można powiedzieć, że przez cały czas trwania dializy wyraźnie występowało istnienie jakiegoś bardzo ścisłego związku między enzymem a tą frakcją białka wyciągu wodnego, która przy dializie nie ulegała wytrąceniu, a więc była rozpuszczalna w wodzie pozbawionej prawie całkowicie elektrolitów.

Z szeregu doświadczeń przeprowadzonych w tym kierunku przytoczyć można następujące:

Wyciąg ze słodu, przygotowany w sposób wyżej podany, poddano dializie.

Wykazywał on obecność białka, ilość którego nie została określona.

Zawartość suchej substancji wynosiła — 8%.

Składników mineralnych — 4,1% suchej masy.

pH wyciągu było równe 5,9.

300 ccm tego wyciągu poddano dializie wobec wody destylowanej ze szkła. Ogólna ilość wody zużytej do dializy stanowiła 14 l. Dializat wykazywał, zgodnie z tem co podano wyżej, osad brunatny wytrąconego białka. Po odsączeniu go od wytrąconego osadu białkowego, otrzymano płyn lekko opalizujący, barwy białozółtej. Wykazywał on wyraźną zawartość białka. Bardzo znacznie spadła ilość suchej substancji, wynosiła teraz tylko — 0,06%. Podczas dializy zostało więc usunięte 99,2% suchej masy wyciągu słodowego. Cyfra ta jest trochę wyższa niż otrzymana w analogiczny sposób przez Eulera i Svanberga (3) (98,4%). Zawartość składników mineralnych zmniejszyła się również bardzo znacznie, nie w takim jednak stopniu jak sucha substancja. Ogólna ilość popiołu wynosiła teraz 22 razy mniej niż przed dializą, w odniesieniu jednak do suchej masy wypadło go znacznie więcej, bo 26,6% zamiast — 4,1% było go więc 6-cio krotnie więcej. Zmniejszyła się również znacznie, około 30-krotnie, zawartość substancyj redukujących.

Z wyciągiem dializowanym przesączonym i z osadem białkowym wytrąconym podczas dializy, rozpuszczonym w norm. roztworze chlorku sodu, wykonano doświadczenie nad zdolnością hydrolizowania przez te dwa płyny skrobi.

Doświadczenie odbywało się w temp. pokojowej ($18^{\circ} - 1^{\circ} \text{C}$) i trwało 72 godziny. Ilość płynu reagującego była wszędzie ta sama, mianowicie 52,5 cm, z czego 50 cm stanowiła 2%-wa skrobia rozpuszczalna Kahlbauma, a 2,5 cm wyciąg dializowany, względnie odpowiednia ilość osadu rozpuszczonego w chlorku sodu. Przytem osadu rozpuszczonego w chlorku sodu wzięto w jednym wypadku tyle ile wyciągu dializowanego, w drugim zaś podwójną ilość tego. pH płynów badanych wahało się od 3,9 do 4,1. Aby wyeliminować wpływ samego chlorku sodu, dodano do jednej próby tylko odpowiednią ilość tej soli bez żadnego czynnika enzymatycznego. i do jednej próby, zawierającej wyciąg dializowany, odpowiednią ilość chlorku sodu.

Rozkład badano jakościowo metodą Wohlgemutha, równolegle zaś metodą Bertranda oznaczano ilość cukrów redukujących. Wyniki ilustruje tablica I.

TABLICA I.

Nr. kolby	przes. w cm	osad w cm	n/1 NaCl w cm	H ₂ O w cm	barwa z J po 72 g.	Cu w mg po 48 g.
1	1,25			1,25	czerw.	14,5
2	1,25		1,25		czerw-fiol.	13,3
3(kontr.)			1,25	1,25	granat.	0,8
4		1,25		1,25	„	1,3
5	2,50				żółta	15,6
6		2,50			granat.	1,3

Z doświadczenia wynika, że osad białkowy, wytrącony z wyciągu podczas dializy, nie posiada żadnej zdolności hydrolitycznej w stosunku do skrobi, ani próba z jodem, ani oznaczanie cukrów redukujących nie dało żadnego rezultatu.

To samo doświadczenie, powtórzone z podwójnymi w stosunku do poprzednich ilościami wyciągu dializowanego i osadu, dało wyniki identyczne.

A więc białko wytrącające się podczas dializy, nierozpuszczalne więc w wodzie zawierającej mało elektrolitów, nie ma zdolności enzymatycznych. Można więc założyć, że nie stoi ono

w żadnym związku z czynnikiem enzymatycznym, nie stanowi jego części składowej, nie stanowi też podłoża, na którym enzym się adsorbuje.

W dalszej serii doświadczeń starano się w silniejszym jeszcze stopniu oddzielić białko od enzymu, zawartego w wyciągu słodowym dializowanym.

Użyto do doświadczenia 550 ccm wyciągu sporządzonego w sposób jak podano poprzednio.

Zawierał: suchej masy	8%
popiołu w stosunku do suchej masy	3,8%
azotu " " " "	2,34%
w tem " białkowego	0,75%
" niebiałkowego	1,56%

stosunek więc azotu białkowego do niebiałkowego był: 1 : 2. Wyciąg ten poddano dializie w sposób poprzednio podany. W rezultacie otrzymano, jak zwykle, płyn opalizujący, białło-żółtawy z dość obfitym, brunatnym, ciągliwym osadem. Po oddzieleniu osadu płyn odwirowany zawierał suchej masy 0,04%.

Próby jakościowe na białko, a więc: strącanie kwasem pikrynowym, odczynnikami Millona i ksantoproteinowa wypadły dodatnio, ale znacznie słabiej niż w wyciągu surowym.

Analiza azotowa wykazała w procentach suchej masy:

azot białkowy	6,3%
„ niebiałkowy	1,06%

stosunek azotu białkowego do niebiałkowego zmienił się więc z 1 : 2 na 6 : 1.

W wyciągu surowym na każdy gram suchej masy przypadało 23 mg azotu, w wyciągu dializowanym przypadało go na 1 gr suchej masy 73 mg.

Wobec tego, że próby dokonane z wyciągiem surowym wykazały, że można bez uszkodzenia a nawet osłabienia enzymu strącać z niego białko octanem ołowiu, spróbowano zastosować tę metodę dla usunięcia resztek białka z wyciągu przedializowanego. W tym celu wyciąg dializowany skoncentrowano 8-krotnie przy 40° C w próżni i zadano go kilkoma kroplami 1%-owego octanu ołowiu. Powstały osad białka oddzielono na sączku, przesącz zaś, dla uwolnienia go od resztek octanu ołowiu, poddano dializie. Po dwu-

dniowej dializie płyn nie wykazywał już obecności ołowiu. Zbadany na zawartość białka zwykle stosowanymi odczynnikami, a więc kwasem pikrynowym, odczynnikiem Millona i kwasem azotowym, wykazał całkowitą nieobecność tych ciał. Doświadczenie nad jego zdolnością hydrolityczną wobec skrobi dało jednak również wynik ujemny. Wyniku tego nie można położyć na karb braku elektrolitów, gdyż również dodanie do badanego płynu popiołu z wyciągu surowego, co zwykle wpływa korzystnie na wyciąg dializowany, w niczym nie zmieniło jego zdolności, a raczej braku zdolności hydrolitycznej wobec skrobi. Zjawisko to należy tłumaczyć tem, że octan ołowiu stracił całą resztę białka, a z nim i enzym zawarty w wyciągu.

Przez cały czas trwania tego doświadczenia można było znów zaobserwować równoległość między zawartością białka w płynie badanym, a jego aktywnością enzymatyczną. Najsilniejszy jest wyciąg surowy, zawierający białka najwięcej, słabszy już dializowany, zawierający go mniej niż surowy, wyciąg zaś, otrzymany po całkowitem usunięciu białka (octanem ołowiu), jest już zupełnie enzymatycznie nieczynny.

2. FRAKCJONOWANE WYCIĄGANIE ENZYMU.

Do takich samych wniosków doprowadziło stosowanie frakcjonowanego wyciągania enzymu ze słoðu.

Zastosowano następujące płyny do ekstrakcji:

- a) alkohol 96%-owy,
- b) woda destylowana,
- c) ług potasowy 0,2%-owy,
- d) chlorek sodu 10%-owy.

200 gr słoðu zalano 600 ccm alkoholu 96%-owego, mocno skłócono i zostawiono w temp. pokojowej na 5 godzin. Po tym czasie wyciąg alkoholowy odsączono i pozostałość słoðu, po odparowaniu na powietrzu resztek alkoholu, zalano 600 ccm wody destylowanej. Po upływie 5-ciu godzin znów odsączono wyciąg wodny i pozostały sólð traktowano kolejno w ten sam sposób ługiem potasowym 0,2%-owym i chlorkiem sodu 10%-wym, otrzymując wyciągi w tych płynach.

Otrzymane 4 wyciągi wykazywały następujące własności:

	stos. s. masy	azot w % s. masy	zawart. enzymu	zawart. białka
wyciąg wodny . .	1,0	2,7	+	++
„ alkoholowy	3,9	0,9	—	+
„ w KOH . .	2,3		—	+
„ w NaCl . .	1,0	0,57	—	+
słód suchy . . .	—	1,52		

Wynika stąd, że enzym jest zawarty tylko we frakcji wodnej, a więc jest związany z białkami rozpuszczalnymi w wodzie. Wyciągi w alkoholu, w chlorku sodu i w ługu potasowym również białko zawierają, a jednak nie wykazują żadnego działania hydrolitycznego w stosunku do skrobi.

3. FRAKCJONOWANE STRĄCANIE BIAŁEK PRZY RÓŻNEM pH.

Z serii pierwszej i drugiej doświadczeń wynikało, że to białko z którym enzym jest w sposób bliżej niezbadany, czy to przez siły powierzchniowe, czy w sposób chemiczny, — związany, należy do białek rozpuszczalnych łatwo w czystej wodzie, niezawierającej elektrolitów. W pierwszym przybliżeniu możnaby więc powiedzieć, że jest on związany z albuminami.

W tej serii doświadczeń starano się w inny jakiś sposób rozdzielić białka, występujące w wyciągu ze słodu na frakcje różniące się między sobą. Zastosowano strącanie białek zapomocą kwasu octowego przy różnem stężeniu jonów wodorowych, które osiągnęto, przez stosowanie kwasu o różnej koncentracji. Jak wiadomo, białko strąca się z roztworu w swoim punkcie izoelektrycznym. Spodziewano się więc, że przez zastosowanie różnych pH uda się wywołać strącenie różnych frakcyj białek, zależnie od tego dla której z nich stosowane pH stanowi jej punkt izoelektryczny. W dalszym ciągu zaś łatwo już można skonstatować, z którą z tych frakcyj jest związany enzym.

Metodyka. 10 ccm wyciągu ze słodu nalewano do kolbki miarowej, pojemności 50 ccm, dolewano odpowiednią ilość kwasu octowego, dopełniano wodą destylowaną do 50 ccm i strącano białko w łaźni wodnej przy 40° C w ciągu 10 min. Po ostudzeniu oznaczano pH płynu i zostawiano go w temp. 5°—10° C na 24 godz. Po

tym czasie oddzielano płyn od osadu zapomocą wirówki i zbierano oddzielnie płyn i osad.

Osady zebrane przemyto kilkakrotnie wodą podwójnie destylowaną ze szkła i sprawdzono zdolność hydrolityczną w stosunku do skrobi poszczególnych osadów i wód użytych do ich przemycia.

Sprawdzono również zapomocą kwasu pikrynowego, które płyny z przemycia osadów zawierają białko.

Okazało się, że wszędzie tam, gdzie osad wywoływał rozkład skrobi, wywoływała go również woda, użyta do przemycania tych osadów i w każdym wypadku woda ta zawierała białko. Przytem było to znów białko rozpuszczalne w wodzie, a więc o charakterze albumin.

We wszystkich wypadkach zaś, gdzie osad nie rozkładał skrobi, nie rozkładała jej również woda użyta do przemycania i w każdym takim wypadku nie zawierała ona białka.

Ilustruje to poniższa tablica II.

TABLICA II.

Nr. próby	strąc. przy pH	zawart. enz. w osadzie	zawart. enz. w wodzie	zawart. biał. w wodzie
0	6,00	—	—	—
1	5,74	+++	+	+
2	5,59	+++	+	+
3	5,34	+++	+	+
4	5,18	+++	+	—
5	5,00	+++	+	+
6	4,88	++	+	+
8	4,74		+	+
9	4,64	+++	+	+
11	4,48	++	+	+—
12	4,32	++	+	+
14	4,38	++	+	+
15	4,04	++	+	+
16	3,88	+	+	+
17	3,86	+—	+	+
18	3,78		—	
19	3,66	+—	—	
21	3,52	—	—	—
22	3,38	—	—	—
23	3,28		—	—
25	3,10	—	—	—
26	3,00	—	—	—
27	2,90	—	—	—
28	2,76	—	—	—

Dwa z otrzymanych przez strącenie kwasem octowym osady poddano bliższej analizie.

O s a d Nr. 6 otrzymany przez strącenie białka przy pH — 4,88, stanowi jeden z tych osadów, które zawierały enzym, a więc rozkładały skrobię jak również woda użyta do jego przemycia zawierała enzym i białko.

O s a d Nr. 25, otrzymany przez strącenie białka przy pH — 3,10, nie zawiera enzymu, nie rozkłada więc skrobi — to samo stosuje się do wody użytej do jego przemycia. Woda ta również nie zawiera białka.

Oba badane osady rozdzielono na frakcje:

1. rozpuszczalną w wodzie (destylowanej ze szkła),
2. rozpuszczalną w 10 %-owym chlorku sodu,
3. rozpuszczalną w 70 %-owym alkoholu etylowym,
4. rozpuszczalną w 0,1 %-owym ługu potasowym.

Każdą z otrzymanych frakcyj zbadano jakościowo na zawartość białka i na zdolność hydrolizowania przez nią skrobi. Wyniki są podane w następujących tablicach.

O s a d Nr. 6.

TABLICA III.

	w mg	w %-ach	zawart. białka	rozkł. skrobi
osad całkowity	1,9	100		+
frakcja rozp. w H ₂ O	0,3	15,8	+	+
„ „ w NaCl	0,7	36,8	+	?
„ „ w alk.	0,1	5,3	—	—
„ „ w KOH	0,7	36,8	+ +	—
reszta	0,1	5,3		

O s a d Nr. 25.

TABLICA IV.

	w mg	w %-ach	zawart. białka	rozkł. skrobi
osad całkowity	2,3	100		—
frakcja rozp. w H ₂ O	0,0	0	—	—
„ „ w NaCl	0,7	30,4	+	—
„ „ w alk.	0,3	13,0	—	—
„ „ w KOH	1,1	47,8	+ +	—
reszta	0,2	8,7		

Powyższe tablice wyraźnie wykazują, że czynnik enzymatycznie czynny jest związany, z frakcją białek rozpuszczalnych w wodzie. Zdolności hydrolitycznej w stosunku do skrobi nie wykazuje ani frakcja rozpuszczalna w NaCl, ani rozpuszczalna w KOH, choć obie one zawierają substancje białkowe i to w ilości dwukrotnie większej niż frakcja wodna.

Osad Nr. 25 nie rozkłada skrobi, nie zawiera on też frakcji białek rozpuszczalnych w wodzie — znów więc potwierdza się, że tylko ta frakcja białek jest nosicielem funkcji enzymatycznej.

Te same analizy wykazują jednak, że przypuszczenie, iż drogą strącania przy różnym pH uda się oddzielić od siebie poszczególne frakcje białka, było mylne. Oba badane osady zawierają mieszaninę białek — osad Nr. 6 — mieszaninę trzech frakcyj, osad zaś Nr. 25 — dwie frakcje. Należy jednak mieć na uwadze, że strącanie się białka w jego punkcie izoelektrycznym powoduje porwanie ze sobą również i białka innego, którego punkt izoelektryczny nie został jeszcze osiągnięty. Przytem proces ten nie daje się ściśle określić; ilość porwanego białka zależy od bardzo wielu czynników: jak od stosunku ilościowego białka strącającego się do porywanych, od ich stopnia dyspersji i t. p. Stosunkowe ilości poszczególnych frakcyj białek w obydwóch osadach są też równego rzędu. Zastanawiający jest brak w osadzie Nr. 25 frakcji rozpuszczalnej w wodzie. Należy założyć, iż bądź pH — 3,10 nie stanowi jej punktu izoelektrycznego, bądź nie uległa ona zupełnie „porwaniu” wraz z białkiem strącającym się, bądź też wreszcie uległa daleko posuniętym zmianom pod wpływem dodanego kwasu octowego. To ostatnie przypuszczenie jest najbardziej prawdopodobne, tembardziej, że jak to widać z tablicy V, płyn odwirowany Nr. 25 również skrobi nie rozkłada.

Zbadano również wszystkie płyny, otrzymane po odwirowaniu osadów. Oznaczono w nich azot białkowy (strącano białko wolframianem sodu z kwasem siarkowym) i określono ich zdolność hydrolizowania skrobi jakościowo (metodą Wohlgemutha) i ilościowo przez oznaczanie cukrów redukujących metodą Bertranda.

Mieszaniny reagujące zawierały wszystkie po: 50 cm 2%-owej skrobi rozpuszczalnej Kahlbauma, 2 cm płynu reagującego i odpowiednią ilość wody dest. dla zrównania koncentracji. pH mieszanin wahało się od 4,56 do 4,66.

Doświadczenie przebiegało w temp. 18°—20° C, czas trwania — 24 godz.

Próby brano co 2 godziny, ostatnią zaś po 24 godz.
Wyniki ilustruje tablica V.

TABLICA V.

Nr. próby	pH pocz. mieszan.	pH końc. mieszan.	rozkł. po 24 g. Jod.	rozkł. po 23 g. mgCu	azot w %
0	4,56	4,58	jasno-żółta	12,0	7,33
1	4,65	4,72	" "	12,6	
2	4,60	4,62	" "	11,3	5,79
3	4,64	4,66	" "	12,7	5,90
4	4,60	4,60	" "	12,0	5,04
5	4,66	4,67	" "	12,0	
6	4,64	4,66	" "	12,6	
8	4,62	4,66	" "	12,6	5,18
9	4,66	4,66	" "	12,1	5,48
11	4,66	4,66	żółta	12,1	
12	4,66	4,67	jasno-żółta	12,7	
14	4,64	4,66	czerwona	11,8	5,60
15	4,64	4,68	fiol-czerw.	10,7	
16	4,62	4,66	" "	10,3	5,48
17	4,62	4,63	fioletowa	9,8	
18	4,64	4,64	fiol-granat.	10,4	
19	4,64	4,62	" "	9,9	4,56
21	4,59	4,60	gran-fiolet.	10,0	
22	4,62	4,62	" "	9,6	
23	4,62	4,62	granatowa	9,7	5,79
25	4,58	4,54	"	1,5	4,84
26	4,56	4,54	"	0,5	
27	4,60	4,58	"	0,4	5,18
28	4,60	4,63	"	0,3	5,18

Następne doświadczenie tej serii zostało wykonane w sposób analogiczny do poprzedniego z tą różnicą, iż stosowano większe odstępę pH przy strącaniu białek.

Mianowicie strącano przy pH równem:

5.74, 4.88, 4.60, 4.36, 4.00, 3.54, 3.28.

Próby jakościowe na zawartość białka wykazały, że białko z wyciągu surowego rozdzieliło się między przesącz i osad. W żadnym wypadku nie nastąpiło strącenie całkowitej ilości białka z wyciągu, taksamo nie było żadnej próby, w którejby wcale nie nastąpiło strącenie osadu białkowego. Zjawisko to zostało już omó-

wione powyżej. Tutaj można jeszcze dodać, że staje się ono zupełnie jasnym, jeśli uwzględnimy, że wyciąg słodowy zawiera białko nie jednego, a kilku typów i dlatego też przy każdym pH stosowanym wytrąca się przede wszystkim tylko ta frakcja białek, dla której stosowane pH stanowi jej punkt izoelektryczny, lub leży w jego pobliżu — punkt ten zaś jest różny dla różnych białek. Poza to wchodzi tu jeszcze w grę tak zwana okkluzja t. j. porywanie mechaniczne przez białko strącone innych substancyj, a więc i białek koloidalnie, rozproszonych w płynie.

Z otrzymanych przesączów, po oddzieleniu osadów, niezmienną siłę enzymatyczną w porównaniu z wyciągiem wyjściowym miały te tylko przesącze, z których białko uległo strąceniu przy Ph — 4,8 i 4,66.

Wszystkie pozostałe przesącze strącane przy pH niższym od 4,64 do pH — 3,28, wykazywały osłabienie swojej aktywności enzymatycznej. Można by stąd wnioskować, że te frakcje białek wyciągu słodowego, których punkt izoelektryczny leży w pobliżu pH = 4,6—4,8 nie są związane z enzymem.

Niestety niema dostatecznej ilości badań co do wartości punktów izoelektrycznych białek roślinnych. Z danych P e a r s a l l a i E w i n g a (15) wynika, że punkt izoelektryczny dla większości białek roślinnych przez nich badanych, leży przy pH = 4,3—4,5. Wymienieni autorzy nie podają jednak w swoich wynikach punktów izoelektrycznych dla białek jęczmienia. Dla gluteniny i gliadyny, a więc glutelin i prolamin występujących w ziarnie pszenicy, punkty te leżą przy pH = 4,4—4,5 dla gluteniny i 3,5—5,5 dla gliadyny. Można by z dużym prawdopodobieństwem przypuścić, że punkty izoelektryczne dla prolamin i glutelin jęczmienia zawarte są w tych samych granicach pH. Wynikałoby stąd, że w naszym wypadku przy pH = 4,6 — 4,8 zostały strącone z wyciągu słodowego prawie wszystkie białka w nim zawarte, prócz albumin.

Otrzymane wyniki znów więc potwierdzają poprzednie, mianowicie, że enzym diastatyczny jest powiązany jedynie z albuminami.

Jeśli założyć, że enzym stanowi substancję o charakterze niebiałkowym, jedynie zaadsorbowaną mechanicznie lub elektrycznie na białku, to byłoby bardzo trudno wytłómaczyć jego uporezywe towarzyszenie wyłącznie jednej, a mianowicie albuminowej, frakcji białek. Należałoby się spodziewać, że nie tylko albumina ale i inne białka mogą go adsorbować.

Występowanie funkcji enzymatycznej jedynie w frakcji albuminowej, daje wszelkie pozory prawdopodobieństwa mniemaniu, że enzym sam jest substancją białkową, albuminową.

4. ADSORBCJA.

Na bibule. Wobec tego, że w literaturze spotyka się próby adsorbowania enzymów na bibule, (J. Effront (2)) zwłaszcza, że ewentualna adsorbcja enzymu na bibule ma duże znaczenie praktyczne, gdyż przy zabiegach preparacyjnych często sączymy przez bibulę, — zastosowano również w niniejszej pracy adsorbcję amylazy na bibule. Próby adsorbcji enzymu diastatycznego na bibule miały charakter jedynie jakościowych.

Używano bibulę zwykłą do filtrowania drobno sproszkowaną, lub częściowo shydrolizowaną. Okazało się, że enzym jak i białko adsorbuje się na takiej bibule jedynie w bardzo słabym stopniu, niezależnie od tego, czy stosowano bibulę sproszkowaną, czy też częściowo shydrolizowaną.

Najważniejsze jest jednak to, że enzym adsorbuje się w takim samym stopniu jak białko — w miarę ubywania białka ubywa również enzymu. Wyciągi, zawierającego mniej białka, są jednocześnie uboższe w enzym. Readsorbcja enzymu bez białka nie udaje się.

Przeprowadzono również próby adsorbowania enzymu na azbeście. Azbest adsorbuje w stopniu trochę silniejszym niż bibulę, ale podobnie jak na bibule enzym i białko ulegają na nim adsorbcji w równym stopniu.

Gdyby białko nie stanowiło składowej części molekuly enzymu, a miałoby jedynie charakter adsorbensu dla enzymu, to byłoby do pomyślenia, że azbest po pewnym czasie, przy kolejnem adsorbowaniu na nim białka i enzymu, nasyci się niejednocześnie białkiem wzgl. enzymem. Można by więc osiągnąć taki stan, że azbest nie adsorbowałby więcej białka, a adsorbowałby jeszcze enzym, lub też odwrotnie—po „nasyceciu” się enzymem przestałby go adsorbować, a wiązałyby powierzchniowo w dalszym ciągu białko. W pierwszym wypadku otrzymanoby płyn zawierający białko a pozbawiony enzymu, w drugim zaś płyn poddawany adsorbcji zawierałby enzym, przy nieobecności substancyj białkowych.

To jednak mogłoby nastąpić jedynie w wypadku, gdyby azbest posiadał różną zdolność adsorbeyjną w stosunku do enzy-

mu i białek. Przy jednakowej zdolności adsorbowania tych dwóch ciał, ich oddzielenie od siebie drogą adsorpcji nie może dać wyników pozytywnych.

Doświadczenie było przeprowadzone w ten sposób, że na określonej ilości azbestu (Merck'a do analiz) adsorbowano 1 litr surowego wyciągu słodowego czterokrotnie. Przy każdej adsorpcji wytrząsano dokładnie mieszaninę azbestu z wyciągiem i pozostawiano na 24 godz. Po tym czasie sączono. W przesączu oznaczano: 1) azot całkowity met. Kjeldahla, 2) obecność białka odczynnikami Essbacha, 3) procentową zawartość suchej substancji i 4) siłę enzymatyczną, mierzoną ilością powstałych cukrów redukujących metodą Bertranda.

Wyniki ilustruje tablica VI.

TABLICA VI.

	sucha m. w %-ach	N całk. w % s. m.	Cu w mg	Obecn. białka
wyciąg wyjściowy	1,39	3,2	136,8	—
„ po I-ej ads.	1,37	2,9	—	—
„ po II-ej ads.	1,37	2,7	131,3	—
„ po III-ej ads.	1,37	2,7	120,4	—
„ po IV-ej ads.	1,39	2,6	123,8	—

Z tablicy wynika, że nie udało się osiągnąć takiego punktu, kiedy bądź białko, bądź enzym jużby nie podlegał adsorpcji przez azbest. Procesy te zachodzą równolegle. Wszystkie badane przesącze zawierały i białko i enzym. Z procentowej zawartości azotu można by wnioskować, że część białka uległa adsorpcji, ale proces ten już po II-ej adsorpcji przestał się posuwać naprzód. — to samo mniej więcej zachodzi z enzymem.

Po pierwszej adsorpcji ilość enzymu nieznacznie się zmniejszyła, ale zaczynając od trzeciej adsorpcji już nie ulegała zmianie. Ta równoległość w procesie adsorpcji enzymu i białka daje się wytłómaczyć tylko wówczas, jeśli założymy, że enzym jest substancją białkową, a nie tylko zaadsorbowaną na białku.

Zaadsorbowany na azbecie enzym udało się zeń eluować stosując readsorpcję fosforanami według Willstaettera. Eluat ten jednak znów obok enzymu zawierał białko. Próby z odczynnikami

Essbacha i Millona wypadły dodatnio, — ninhydrynowa — ujemnie. Pozatem eluat zawierał węglowodany.

Adsorbcja na węglu aktywowanym.

Adsorbcja na węglu była wielokrotnie stosowana w pracach nad izolowaniem enzymów wogóle, a diastazy w szczególności. Stosowano jednak zawsze węgiel zwierzący. Między innymi Michaelis i Ehrenreich (12) w swoich doświadczeniach nad adsorbcją enzymów, mających za cel określenie charakteru elektrochemicznego badanych enzymów, stosowali również węgiel zwierzący (kostny i krwi). Diastaza roślinna ulegała u tych badaczy całkowitej adsorbcji na węglu, przy zastosowaniu odczynu obojętnego lub kwaśnego.

W naszym wypadku, ze względu na bardzo silnie rozwinięte siły powierzchniowe węgla aktywowanego, użyto ten ostatni celem oczyszczenia drogą adsorbcji diastazy z wyciągu słodowego.

Do adsorbcji użyto wyciąg przygotowany w sposób poprzednio podany. Był on częściowo pozbawiony białka, siłę enzymatyczną wykazywał jednak równą wyciągowi wyjściowemu. Stosowano węgiel aktywowany Kahlbauma. Adsorbcja odbywała się w środowisku o $\text{pH} = \pm 5$.

Zastosowano 3 różne ilości adsorbentu:

1. 8,1327 gr.
2. 3,1255 gr.
3. 1,7326 gr.

Każdą z powyższych ilości węgla zalano 100 ccm. wyciągu i po skłóceniu zostawiono w temp. pokojowej na 14 godzin. Po tym czasie sączono.

Okazało się, że w pierwszej i drugiej próbie cały enzym został zaadsorbowany, a wraz z nim również całkowicie białko z wyciągu. Płyn po przesączeniu był całkowicie bezbarwny i klarowny. Nie wykazywał on żadnej zdolności hydrolitycznej wobec skrobi, taksamo wszystkie zastosowane próby na wykrycie białka a więc: odczynnikami Essbacha, Millona i ksantoproteinowa — dały wynik ujemny. Próba trzecia zawierała ilość węgla zbyt małą do zaadsorbowania w tych warunkach całkowitej ilości enzymu i białka z wyciągu. Otrzymano w tym wypadku płyn rozkładający skrobię i zawierający białko.

Różnice te ilustruje tablica VII:

TABLICA VII.

Nr. próby	enzym w przes.	enzym w ads.-cie	białko w przes.	pH przes.
1	—	+	—	5,27
2	—	+	—	4,95
3	+++	+	+	4,81

Różnicy w działaniu hydrolitycznem wyciągów 1-go, 2-go i 3-go nie można położyć na karb nieodpowiedniego pH. We wszystkich trzech płynach pH było zawarte w granicach optimum.

Znów więc ten tylko przesącz rozkłada skrobię, który zawiera przynajmniej w minimalnej ilości białko.

Dla wyizolowania zaadsorbowanego enzymu z adsorbentów zastosowano następujące środki do readsorbcji:

1. wodę destylowaną pH — 5,0,
2. glicerynę 100 %-ową pH — 4,7,
3. wodę dest. zakwaszoną HCl pH — 3,9,
4. wodę dest. zalkalizowaną NaOH pH — 8,2,
5. glicerynę 100 %-ową zakw. HCl pH — 4,0,
6. glicerynę 100 %-ową zakw. NaOH pH — 8,4.

Po 16-u godzinach oddzielono eluaty od węgla, sącząc przez azbest. Otrzymane przesącze sprawdzono na obecność białka odczynnikami Essbacha i na obecność enzymu. Tak samo sprawdzono, czy węgiel pozostały po adsorbcji zawiera enzym.

Wyniki ilustruje tablica VIII:

TABLICA VIII.

Nr. węgla	eluow. przez	pH eluantu	pH eluatu	enzym w eluacie	enzym w węglu	białko w eluacie	rozkl.p. eluat pH	rozkl.p. węgiel pH
1	H ₂ O dest.	5,0	3,7	—	—	±	4,3	5,1
2	glicer.	4,7	3,7	—	+		4,3	
3	glicNaOH	8,4	4,3	±	+		5,2	
4	„ HCl	4,0		+	+		4,3	
5	HCl	3,9	3,5	—	±	—	4,9	4,6
6	NaOH	8,2	4,7	—	—	—	5,2	4,3

Okazuje się więc, że najlepszym środkiem do readsorbeji enzymu z węgla jest gliceryna, zakwaszona kwasem solnym do $\text{pH} = 4,0$. Eluat, otrzymany przez readsorbeję gliceryną z kwasem solnym, poddano dalszemu procesowi oczyszczania. Najprzód uległ dializie. Po dwóch dniach, gdy płyn dializowany nie wchłaniał więcej wody, odparowano go w próżni w temp. 40°C . do objętości równej połowie objętości przed dializą.

Jego siła enzymatyczna w porównaniu z surowym wyciągiem słodowym była około 100 razy zmniejszona.

suchej substancji zawierał — 0,015%,

próby z odczynnikami Essbacha, Millona, ninhydrynowa — ujemne. Dawał natomiast reakcję na węglowodany odczynnikami Molischa i na curky redukujące odczynnikami Fehlinga. Otrzymano więc w rezultacie płyn, niewykazujący reakcji dodatniej na białko, a czynny enzymatycznie. Brak reakcji dodatniej na białko skłonił nas do tego, że jesteśmy jednak w tym wypadku skłonni nie charakteryzować niebiałkowego enzymu, a zbyt małą jego ilością, by dało się ono stosowanymi metodami wykryć. Otrzymany płyn enzymatycznie czynny zawierał 0,15 mg. suchej masy w 1 ccm. Gdyby substancję tę stanowiło tylko białko, to jak to wynika z tabelki na stronie 172, wszystkie wymienione wyżej odczynniki dałyby odczyn dodatni. Tak jednak nie jest, płyn badany zawiera, jak to wspomniano wyżej, węglowodany. Nie zostało stwierdzone jaką część suchej masy stanowią one, uwzględniając jednak małą czułość odczynnika Fehlinga, należy przypuszczać, że dość znaczną — wobec tego, ewentualna zawartość białka w suchej masie spada poniżej 0,1 mg. w 1 ccm, a wtedy jak wiemy odczynniki na białko dają już wyniki wątpliwe.

Adsorbeja metodą Willstaettera.

Ostatnia serja doświadczeń obejmowała próby oczyszczenia enzymu słodowego metodą Willstaettera, podaną przez niego dla amylazy trzustkowej.

Jako adsorbens służył wodorotlenek glinu, przygotowany według przepisu Willstaettera dla gatunku oznaczonego przez niego jako „Tonerde B”.

Płyn do readsorbeji składał się z:

500 ccm. 1%-owego $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$,

25,4 ccm. norm. NH_4OH ,

350 ccm. wody dest.

Próbowi na adsorbację poddano wyciąg słodowy niedializowany i dializowany.

Wyciąg niedializowany.

Sila tego wyciągu oznaczona metodą Willstaettera równała się 0,02 „Am. E.” (Willstaetterowskich), t. j. w 20 ccm. była zawarta 1 Am. E. (jednostka amylolityczna). Adsorbacja przebiegała w odczynie obojętnym z dodatkiem 50% alkoholu etylowego.

Do 2 ccm. wodorotlenku glinu dolewano 24 ccm. 96%-owego alkoholu etylowego i 20 ccm. wyciągu słodowego. Wszystko to dokładnie mieszano, rozlewano do próbek i poddawano 15-minutowemu wirowaniu. Wodorotlenek glinu wraz ze składnikami zaadsorbowanymi, zbijał się na dnie próbek w twarde, zbity osad. Odciągano wtedy pipetą płyn z ponad osadu i do osadu dolewano mieszaninę readsorbującą. Po mocnem skłóceniu z płynem readsorbującym, poddawano znów 15-minutowemu wirowaniu i odciągano płyn z ponad osadu.

Oba zebrane płyny, t. j. płyn po adsorbacji i płyn po readsorbacji poddano próbom na zdolność rozkładania skrobi. Okazało się, iż oba one zawierają enzym, przyczem pierwszy z nich 6-ciokrotnie więcej niż drugi i przytem nie o wiele mniej, niż wyciąg poddany adsorbacji. Adsorbacja enzymu była więc w tych warunkach doświadczenia, bardzo niekompletna, prawdopodobnie niekompletna była również i readsorbacja. Wobec tego poddano płyn z pierwszej adsorbacji adsorbacji powtórnej, stosując technikę podobną do poprzedniej, jedynie zwiększając czterokrotnie ilość używanego wodorotlenku glinu.

Wynik otrzymany był podobny do poprzedniego. Enzym rozdzielił się pomiędzy oba płyny — część przeszła do readsorbentu, część zaś nie uległa wcale adsorbacji i znajdowała się w płynie zebranym z ponad wodorotlenku glinu. Przytem znów więcej go było w płynie drugim niż w pierwszym. A więc adsorbacja w dal-szym ciągu zachodziła bardzo niecałkowicie.

Proces ten przeprowadzono po raz trzeci z wynikiem takim samym, ale tym razem ilość enzymu w płynie z ponad osadu była już znacznie mniejsza. Wreszcie po zastosowaniu następnej, a więc czwartej adsorbacji, otrzymano enzym głównie w readsorbacie, w płynie adsorbowanym było go już bardzo mało.

Wszystkie zebrane readsorbaty zlane razem, odparowano w próżni przy 40° C. do pierwotnej objętości wyciągu wziętego do

adsorbeji, t. j. do 20 cm. i oznaczono według Willstaettera zawartość w nich enzymu.

Otrzymano $\frac{1}{8}$ „Am. E.” zamiast 1 „Am. E.”, a więc przy tych wszystkich operacjach 66% enzymu zostało utracone. Straty te należy położyć na karb niecałkowitej adsorbeji i readsorbeji i na karb uszkodzenia samego enzymu, prowadzącego aż do jego rozkładu.

Otrzymany płyn enzymatycznie czynny wykazywał jednak zawartość cukrów redukujących i białek.

Wyciąg dializowany.

Poddano adsorbeji wyciąg poprzednio dializowany, a więc częściowo pozbawiony substancyj towarzyszących enzymowi. Zawierał on cukry redukujące i białka, ale w ilości znacznie mniejszej niż wyciąg surowy. Adsorbeję przeprowadzano metodą taką samą jak poprzednio, tylko w dwóch różnych odczynach przy pH — 7 i pH — 4.

Adsorbowano daną próbę czterokrotnie. Readsorbaty otrzymane zlano razem i odparowano w próżni przy 40° C. do pierwotnej objętości. Wobec tego, iż doświadczenie z wyciągiem niedializowanym wykazało, że readsorbeja nie zachodzi w warunkach stosowanych całkowicie, zmieniono metodę o tyle, że po nalaniu readsorbującego płynu do osadu nie wirowano od razu, lecz po 48-u godzinach. Wpłynęło to dodatnio na wynik. Po tak przeprowadzonej readsorbeji osady nie zawierały enzymu wcale, enzym przechodził całkowicie do płynu readsorbującego. Readsorbaty po odparowaniu poddano dializie dla usunięcia fosforanu amonu i ewentualnych resztek alkoholu.

Zbadano teraz funkcję enzymatyczną otrzymanego readsorbatu w porównaniu z wyciągiem dializowanym poddanym adsorbeji. Wykonano to, ze względu na małą ilość materiału, tylko metodą Wohlgemutha, a więc prześledzono jedynie całokształt rozkładu skrobi. Rozkład odbywał się przy pH 6,5;

po 5-ciu godz.:

readsorbat nie spowodował jeszcze żadnego rozkładu,
płyn wyjściowy rozłożył skrobię do barwy czerwonej;

po 24-u godz.:

readsorbat rozłożył skrobię do barwy czerwonej,
płyn wyjściowy — do barwy żółtej.

W ciągu następnych trzech dni rozkład skrobi przez readsorbat postąpił nieco dalej, ale jeszcze po upływie 6-ciu dni nie był zakończony.

Otrzymany więc płyn, w porównaniu z wyjściowym wyciągiem dializowanym, jest wielokrotnie słabszy, zawiera około 30—40 razy mniej enzymu. Próby na zawartość węglowodanów i białek wypadły następująco:

	odecz. Millona	odecz. Essbacha	odecz. Molischea
adsorbeja przy pH 4, readsorbat	—	—	?
" " pH 7, "	—	—	?
wyciąg dializow., wyjściowy	—	—	—

Ze względu na jednakowe zachowanie się i pod względem enzymatycznym i chemicznym readsorbatów z adsorbeji w środowisku kwaśnem i obojętnem, zlano je razem i znów porównano ich działanie na skrobię z wyciągiem wyjściowym użytym do adsorbeji.

Doświadczenie przebiegało w temp. 42° C.:

próbą 1-sza zawierała 50 ccm skrobi 2%-owej + 3 ccm wyc. dializowanego

próbą 2-ga zawierała 50 ccm skrobi 2%-owej + 5 ccm readsorbatu po 24-u godz.

w 10-ciu ccm próby 1-ej było 140 mg cukru redukującego (maltozy)

w 10-ciu ccm " 2-ej " 7,5 mg " " "

enzymu w readsorbacie jest więc około 20-krotnie mniej.

DYSKUSJA.

Reasumując wyniki wszystkich przytoczonych doświadczeń, dochodzimy do wniosku sprzecznego z hipotezą szkoły Willstaettera, a zgodnego z poglądami Osborna, Wróblewskiego, Biedermana, Shermana i wielu innych.

Wynikałoby więc, że enzym diastatyczny, występujący w ziarnach jęczmienia, zawiera białko, należące do typu albumin. Wyników naszych doświadczeń nie można jednak bez zastrzeżeń porównywać z wynikami Willstaettera, ze względu na to, że przedmiotem badań wyżej wspomnianego autora była amylaza trzustkowa, a nie słodowa, — dotychczas zaś nikt jeszcze nie wykazał, że dwa te enzymy są substancjami identycznymi.

Pomijając tę kwestję, można pracom szkoły Willstaettera, a przynajmniej niektórym z nich, uczynić zarzut w naszym mniemaniu bardzo poważny.

Willstaetter i jego szkoła opierali się przy wnioskowaniu o charakterze chemicznym otrzymanych przez nich preparatów enzymatycznych, na występowaniu, względnie braku reakcji dodatniej z odczynnikami białkowymi, głównie z odczynnikiem Millona. Tu jednak kryje się poważne źródło błędu. Operowanie zbyt małymi ilościami może doprowadzić do wniosków wręcz fałszywych.

Przeglądając prace Willstaettera można się natknąć na liczby, wskazujące iż to przypuszczenie nie jest bezpodstawne.

I tak nprz. Waldschmidt-Leitz i Hesse (25) w pracy nad amylazą trzustkową otrzymali końcowy preparat w ilo'ci 2 mg. Do prób brali 0,1 mg. substancji. Jak wynika z danych na str. 172, ilość taka daje pewny wynik dodatni z odczynnikiem Millona. Trudno jednak przypuścić, by w cytowanym wypadku całą suchą masę stanowiło białko, zawsze przecież występują substancję o charakterze węglowodanów. Tak więc ilość białka, jeśli było ono obecne, wynosiło mniej niż 0,1 mg, a wtedy reakcja z odczynnikiem Millona daje wyniki zbyt niepewne, by na jej podstawie można było wnioskować o charakterze chemicznym badanego ciała. Jest więc zupełnie możliwem, iż w otrzymanym przez autorów preparacie białko było obecne, ale uszło uwagi badacza wskutek nieuwzględnienia przez nich ograniczonej czułości reaktywów stosowanych.

Według Willstaettera enzym składa się z koloidalnego nosiciela i z grupy enzymatycznie czynnej, przyczem Willstaetter nie mówi nic bliższego o charakterze chemicznym tego nosiciela. Wszystkie inne ciała, występujące wraz z enzymem po jego wyodrębnieniu, jak białko, węglowodany i inne, uważa za substancje towarzyszące, nazwane przez niego „Begleitstoffe”.

Z naszych doświadczeń wynika, że nie wszystkie ciała występujące wraz z enzymem, mogą ulec oddzieleniu od niego, bez spowodowania głębokich zmian w funkcji badanego enzymu. Nie wszystkie więc one dadzą się podciągnąć pod termin „Begleitstoffe”. Bardziej racjonalne byłoby tu wprowadzenie terminu Foodora (5) „Fermentträger” dla tych zpośród substancyj towarzyszących, usunięcie których powoduje zanik, lub silne osłabienie funkcji enzymatycznej. W naszym wypadku część substancyj białkowych, występujących wraz z enzymem w wyciągu słodowym, daje się stosunkowo łatwo oddzielić odeń, przyczem nie jest to po-

wiązane ze zmianami w funkeji enzymatycznej badanej diastazy.— stanowiłyby więc one „Begleitstoffe” — substancje — ciała towarzyszące w ścisłym tego słowa znaczeniu. Pewien jednak składnik tych substancyj, mianowicie białko rozpuszczalne w czystej wodzie, a więc typu albumin — ma już znaczenie inne. Ulega ono bardzo trudno oddzieleniu od czynnego enzymatycznie kompleksu i usunięcie go prowadzi za sobą zanik funkeji enzymatycznej tego kompleksu. Proces ten należałoby więc raczej nazwać rozbięciem istniejącego związku, niż oddzieleniem od niego składnika białkowego.

Ten składnik należałoby więc traktować inaczej. Może to być: 1) „Fermentträger” w znaczeniu Fodora, bądź 2) jeden ze składników koloidalnego nośnika enzymu, w sensie Willstättera, bądź też wreszcie 3) istotny składnik grupy enzymatycznie czynnej.

W każdym razie pozostaje pewnem, że frakcja białek rozpuszczalnych w wodzie, występujących wraz z enzymem diastatycznym w wyciągu słodowym, ma dla jego funkeji znaczenie istotne i niezbędne.

Pozostaje tylko niewyjaśnione, w jaki sposób substancja ta jest powiązana z enzymem, czy jest to związek o charakterze chemicznym, czy fizyko-chemicznym.

WNIOSEK.

1. Enzym diastatyczny występujący w słodzie jest zawarty w frakcji wodnej wyciągu słodowego, a więc występuje razem z białkami słodów rozpuszczalnymi w wodzie.

2. Zpółród tych białek jedynie albumina, białko rozpuszczalne w wodzie pozbawionej elektrolitów, stoi w bliższym związku z enzymem. Wykazuje to dializa i frakcjonowanie strącanie białek z wyciągu.

3. Oczyszczanie enzymu drogą adsorbcji na: bibule, azbest, węgiel aktywowany i wodorotlenku glinu, prowadzi do płynów, wykazujących czynność enzymatyczną dopóty, dopóki występują w nim ilości białka dające się wykryć normalnie stosowanymi reaktywami. Usunięcie resztek substancyj białkowych, aż do zaniku reakcyj białkowych, powoduje całkowity zanik funkeji enzymatycznej, bądź jej wielokrotne osłabienie.

4. Białkiem niedającym się odzielić od enzymu, bez spowodowania głębokich zmian w jego funkeji, a więc związanym z nim

w sposób praktycznie nierozdzielny, — jest białko należące do grupy albumin.

Niech mi wolno będzie wyrazić głębokie podziękowanie Panu prof. Dr. K. Bassalikowi, pod kierunkiem którego praca ta została wykonana, za Jego cenną pomoc i wskazówki.

BIBLIOGRAFJA.

1. Biedermann W. Die organische Komponente der Diastase und das wahre Wesen der Autolyse der Stärke. *Fermentforschung*, **4**, 359, 1921.
2. Effront J. Sur l'absorption de la pepsine par les papiers a filtrer. *Comptes rend. de la Soc. de Biol.*, **87**, 1058, 1922.
3. Euler H. u. Svanberg O. Über die Charakterisierung v. Amylaselösungen. *Ztschr. f. physiol. Chemie*, **112**, 193, 1921.
4. Flancerówna G. Wpływ jonów na amylazę roślinną. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, **7**, 521, 1930.
5. Fodor A. u. Frankenthal L. Über das Wesen der Fermentwirkung im allgemeinen. *Bioch. Ztschr.*, **228**, 101, 1930.
6. Fraenkel S. u. Hamburg M. Über Diastase I Mitteilung. Versuche zur Herstellung von Reindiastase und deren Eigenschaften. *Beiträge z. chem. Physiologie u. Pathologie*, **7**, 389, 1906.
7. Fricke R. u. Kaja U. Über Fermentreinigung durch Elektro-Dialyse und Elektro-Osmose, I-Malzdiastase. *Berichte d. deutsch. chem. Ges.*, **57**, 310, 1924.
8. Fricke R. u. Kaja P. Über die Reinigung von Malzdiastase durch Elektro-Dialyse u. Elektro-Osmose, II Mitteilung. *Berichte d. deutsch. chem. Ges.*, **57**, 765, 1924.
9. Luers H. u. Sellner E. Beiträge zur Reinigung der Malzamyase. *Wochenschr. f. Brauerei*, **42**, 97, 1925.
10. Luers H. u. Sellner E. Beiträge zur Reinigung der Malzamyase. *Wochenschr. f. Brauerei*, **42**, 103, 1925.
11. Luers H. u. Sellner E. Beiträge zur Reinigung der Malzamyase. *Wochenschr. f. Brauerei*, **42**, 110, 1925.
12. Michaelis L. u. Ehrenreich M. Die Adsorptionsanalyse der Fermente. *Bioch. Ztschr.*, **10**, 283, 1908.
13. Osborne a. Campbell. *Journ. of the am. chem. Soc.*, **17**, 587, 1895.
14. Osborne a. Campbell. *Journ. of the am. chem. Soc.*, **18**, 536, 1896.
15. Pearsall W. H. a. Ewing J. The isoelectric points of some plant proteins. *The bioch. Journ.*, **18**, 329, 1924.
16. Fribram E. Über Diastase II. Weitere Versuche zur Herstellung von Reindiastase u. deren Eigenschaften. *Bioch. Ztschr.*, **44**, 293, 1911.
17. Sherman H. C. a. Schlesinger M. D. Studies on amylases III. Experiments upon the preparation a. properties of pancreatic amylase. *Journ. of amer. chem. Soc.*, **33**, 1195, 1911.

18. Sherman H. C. a. Schlesinger M. D. Studies on amylase IV. A further investigation of the properties of pancreatic amylase. Journ. amer. chem. Soc., **34**, 1104, 1912.
19. Sherman H. C. a. Schlesinger M. D. Studies on amylase X. Further experiments upon the purification of malt amylase. Journ. amer. chem. Soc., **37**, 643, 1915.
20. Sherman H. C. a. Schlesinger M. D. Studies an amylase X. Comparison of certain properties of pancreatic a. malt amylase preparations. Journ. amer. chem. Soc., **37**, 1305, 1915.
21. Sherman H. C., Caldwell M. L., Mildred Adams. Enzyme purification. Further experiments with pancreatic amylase. Journ. biol. Chem., **88**, 295, 1930.
22. Sherman H. C., Caldwell M. L., Doebbeling S. E. Further studies upon the purification a. properties of malt amylase. Journ. biol. Chem., **104**, 501, 1934.
23. Wróblewski A. Über die chem. Beschaffenheit der Diastase und über die Bestimmung ihrer Wirksamkeit. Ztschr. f. physiol. Chemie **24**, 173, 1898.
24. Wróblewski A. Über die chemische Beschaffenheit der amylolytischen Fermente. Ber. d. deutsch. chem. Ges. **31** (II), 1130, 1898.
25. Waldschmidt-Leitz E. u. Reichel M. Zur Frage nach der chemischen Natur der Pankreasamylase. Ztschr. f. physiol. Chemie **204**, 197, 1932.
26. Willstaetter R. u. Waldschmidt-Leitz E. Über Pankreaslipase. II. Abhandlung über Pankreasenzyme. Ztschr. f. physiol. Chemie, **125**, 132, 1923.
27. Willstaetter R., Waldschmidt-Leitz E., Hesse A. R. F. Über Pankreasamylase, III, Abhandlung über Pankreasenzyme. Ztschr. f. physiol. Chemie, **126**, 143, 1923.
28. Willstaetter R., Waldschmidt-Leitz E., Hesse A. R. F. Über das Adsorptionverhalten der Pankreasamylase. Ztschr. f. physiol. Chemie, **142**, 14, 1925.
29. Willstaetter R. Über Fortschritte in der Enzymisolierung. Ber. d. deutsch. chem. Ges., **59** 1, 1926.

ZUSAMMENFASSUNG.

Die chemische Natur des amylolytischen Enzyms, welches in der keimenden Gerste auftritt, bleibt noch unaufgeklärt. Es ist fraglich, ob die amylolytische Wirkung des Malzauszuges an die in ihm vorhandenen Eiweiszstoffe gebunden ist, oder ob sie von ihnen unabhängig ist.

Zwecks Entscheidung dieser Frage, wurde eine Trennung des Enzyms von den Eiweiszstoffen mittels folgender Methoden versucht:

1. Dialyse,
2. fraktionierte Extraktion des Enzyms aus dem Malz,
3. fraktioniertes Ausfällen der Eiweiszstoffe bei verschiedenem pH,
4. Adsorption.

Zwecks Bestimmung der enzymatischen Wirkung der untersuchten Malzauszüge wurde die Methode nach Wohlgemuth und die unmittelbare Bestimmung des Zuckers nach Bertrand angewandt.

Die Hauptegebnisse vorliegender Untersuchungen lassen sich folgenderweise zusammenfassen:

1. Bei der Dialyse des Malzextraktes fällt, wenn die Mineralbestandteile fast gänzlich aus dem Dialysat entfernt worden sind, ein bräunlicher, klebriger Niederschlag aus, der hauptsächlich aus Eiweiszstoffen, und zwar aus in HCl und in NaCl löslichen Globulinen, besteht.

Diese Fraktion der Malzeiweiszstoffe enthält keinen enzymatisch tétigen Stoff (vgl. Tab. I p. 176). Die von diesem Niederschlag getrennte Lösung ist enzymatisch wirksam, enthält aber noch viel Eiweiszstoffe. Die Wirkung dieser Lösung wird aber durch Entfernung der Elektrolyte bedeutend abgeschwächt; durch Zugabe von Malzextraktasche lässt sie sich nicht vollständig restituieren.

Man kann infolgedessen annehmen, dass diese Abschwächung einerseits durch den Mangel an Elektrolyten als Aktivatoren des Enzyms, andererseits aber durch Änderung der Dispersion des Komplexes Eiweiszstoffe-Enzym, verursacht ist.

Die Dialyse - Versuche beweisen jedenfalls eindeutig, dass das amylolytische Enzym des Gerstenmalzes nicht an die Globulin - Fraktion, sondern an andere Eiweiszsubstanzen des Malzextraktes gebunden ist.

2. Es wurde darum eine fraktionierte Extraktion des Enzyms versucht, die unter Anwendung der nachstehenden Extraktionsmittel ausgeführt worden war:

- a. Alkohol 95%, hernach,
- b. destilliertes Wasser, dann,
- c. KOH 0,2% und zuletzt,
- d. NaCl 10%.

Alle auf diese Weise erlangten Extrakte enthielten Eiweiss, aber nur der wässrige Extrakt vermochte Stärke zu hydrolisieren: die übrigen waren enzymatisch unwirksam (vgl. p. 179).

Daraus kann man schliessen, dass das Enzym an *diejenigen* Eiweiskörper gebunden ist, welche in *elektrolytfreiem Wasser löslich* sind, d. h. an *albuminähnliche* Substanzen.

3. Zwecks Trennung der verschiedenen, im Malzauszuge vorhandenen Eiweiszstoffe, wurde eine fraktionierte Fällung der letzteren bei verschiedenem pH angewandt: hierzu wurde Essigsäure wechselnder Konzentration gebraucht.

Bei *allen* ausgeführten Fällungen (bei pH 2,7 bis 6,0) erfolgte eine teilweise Ausfällung, bei *keinem* pH aber war sie vollständig.

Die Fällung der einzelnen Eiweiszstoffe erfolgt beim Erreichen ihrer isoelektrischen Punkte. Da aber diese isoelektrischen Punkte nahe aneinander liegen, und, da bei der Fällung durch Okklusion auch andere Eiweiszstoffe mitgerissen werden, — war es unmöglich mit Hilfe dieser Methode die einzelnen Fraktionen voneinander völlig zu trennen.

Die enzymatische Wirkung der von den Niederschlägen abzentrifugierten Flüssigkeiten war stark abgeschwächt, mit Ausnahme der bei pH 4,66 und 4,88 erhaltenen Flüssigkeiten, deren amylytische Wirkung unverändert, d. h. gleich der des Ausgangsmaterials, blieb. Daraus folgt, dass die bei pH 4,66 und 4,88 ausgefällten Eiweiszstoffe in der enzymatischen Funktion des Malzes keinen Anteil nehmen (vgl. p. 184).

Auf Grund der Untersuchungen anderer Forscher (Pearson und Ewing, 14) kann man annehmen, dass bei diesem pH die Albumine des Gerstenkornes nicht gefällt werden.

Aus dieser Versuchsserie lässt sich wiederum mit grosser Wahrscheinlichkeit schliessen, dass die enzymatische Funktion an *albuminähnliche* Stoffe gebunden ist.

4. Schliesslich wurde noch die Adsorption zur Trennung des Enzyms von den Eiweiszstoffen ausgeführt.

Folgende Adsorbentia wurden benutzt:

- a. Filtrierpapier,
- b. Asbest,
- c. aktivierte Kohle und
- d. Tonerde nach Willstätter.

Die erhaltenen Resultate stimmten insofern mit den vorigen überein, dass es nicht gelungen ist, das Enzym von den Eiweiszsubstanzen zu trennen.

In allen mit den oben erwähnten Adsorbentien ausgeführten Versuchen erfolgte die Adsorption des Enzyms *gleichzeitig*

mit der der Eiweiszstoffe. Nach mit verschiedenen Lösungen ausgeführter Readsorption, waren die Flüssigkeiten zwar enzymatisch aktiv, enthielten aber stets Eiweiss (vgl. Tab. VI, VII, p. 186, 188).

Mehrmals wiederholte Adsorptionen und Readsorptionen führten zwar zur weiteren Entfernung der Eiweiszstoffe aus der Lösung, zugleich aber bewirkten sie eine Abschwächung der enzymatischen Funktion. Mit dem Verschwinden der Eiweisreaktion verschwand auch vollständig die enzymatische Wirkung. In einzelnen Fällen liess sich allerdings noch eine äusserst schwache enzymatische Wirkung, — aber stets nur nach Ablauf von mindestens 24 Stunden und nur bis zur Dextrinphase — nachweisen, obwohl mit den üblichen Reagenzien keine Eiweisreaktion mehr auftrat, — vermutlich infolge zu grosser Verdünnung. Hierzu ist aber zu sagen, dass die Eiweisreagenzien viel weniger empfindlich sind als die Probe der biologischen enzymatischen Wirkung. Die geringste Ovalbuminmenge, die ich noch mit Millons Reagenz in 1 ccm H₂O habe nachweisen können, betrug 0,1 mg — (vgl. Tab. p. 172). Es ist darum sehr wahrscheinlich, dass in jenen Lösungen, die die oben angegebene überaus schwache enzymatische Wirkung zeigten, sich noch Albumine in Mengen von unter 0,1 mg befanden — mit deren Anwesenheit die sehr schwache enzymatische Wirkung verbunden war.

Die oben referierten Versuche bestätigen die Auffassung, dass Eiweiszstoffe einen unentbehrlichen Faktor der amylolytischen Funktion bilden. Dies bezieht sich aber, den besprochenen Versuchen gemäss, nur auf die in Wasser löslichen, albuminähnlichen Substanzen.

Die Resultate obiger Versuche geben aber keinen Aufschluss über die Natur der Verbindung zwischen Albumin und Enzym. Es bleibt weiterhin unaufgeklärt, ob das Eiweiss einen Bestandteil der enzymatisch aktiven Gruppe bildet, oder ob es nur als Adsorbens für das Enzym dient.

Institut für Pflanzenphysiologie d. Universität Warschau.

TADEUSZ DOMINIK.

Zakład Botaniki Ogólnej U. P.

GRZYBY PASORZYTNICZE ZEBRANE W OKOLICY WŁOCŁAWKA W SIERPNIU 1934 ROKU.

(*Champignons parasitiques aux environs de Włocławek*).

(Wpłynęło 13.VII. 1935).

W okolicy Włocławka nikt nie prowadził dotychczas systematycznych badań mykologicznych, dlatego też podczas wakacji w sierpniu 1934 roku zebrałem możliwie największą ilość chorych roślin, celem zapoczątkowania pracy na tym terenie. Byłbym nieścisły, gdybym nie nadmienił, że z badanej przeze mnie okolicy są notowane pewne grzyby pasorzytnicze w zestawieniach stacyj fitopatologicznych, lecz dotyczy to jedynie najpospolitszych i najgroźniejszych pasorzytów roślin hodowanych, podczas gdy grzyby pasorzytnicze roślin dzikich nie są absolutnie brane pod uwagę. Warto przy tej sposobności wspomnieć, że jeszcze w 1918—24 roku okolice Włocławka obfitowały w śliczne lasy sosnowe i mieszcane, podczas gdy obecnie rozciągają się na ich miejscu rozległe pola. W następującym zestawieniu zamykam rezultat króciutkich zbiorów i badań.

Jednocześnie na tem miejscu mam zaszczyt serdecznie podziękować Ministerstwa Rolnictwa za łaskawie udzieloną mi pomoc w przeprowadzeniu badań.

Phycomycetes.

- 1) *Cystopus bliti* Biv. na dolnej stronie liści *Amaranthus retroflexus* L., Włocławek, VIII.1934.
- 2) *Cystopus candidus* Lev. na różnych roślinach z rodziny *Cruciferae*, bardzo pospolity. Włocławek, VIII.1934.
- 3) *Peronospora matthiolae* Gäumann na liściach *Matthiola annua*, Włocławek, VIII.1934.

- 4) *Peronospora variabilis* Gäumann na dolnej stronie liści *Chenopodium album* L., Włocławek, VIII.1934.
- 5) *Bremia lactucae* Reg. na dolnej stronie liści *Lactuca muralis* L., Włocławek, VIII.1934.

Basidiomycetes.

Exobasidiales.

- 6) *Erobasidium vaccinii* (Fekl.) Wor. na liściach *Vaccinium vitis idaea* L., bardzo pospolite we wszystkich lasach okolic Włocławka, VIII, 1934.

Ustilaginales.

- 7) *Tubercinia trientalis* Berk. et Br. na liściach *Trientalis europea* L., Kukawy p. Włocławek, VIII.1934.
- 8) *Ustilago zea* (Beckm.) Ung. na *Zea mays* L., pospolita w kulturach: Włocławek, VIII.1934.

Uredinales.

- 9) *Coleosporium sonchi* (Pers.) Lev. na dolnej stronie liści *Sonchus oleraceus* L., Włocławek, VIII.1934.
- 10) *Coleosporium tussilaginis* (Pers.) Kleb. na dolnej stronie liści *Tussilago farfara* L., na oсыпiskach nad brzegiem Wisły, Włocławek, VIII.1934.
- 11) *Cronartium ribicola* Dietr. na dolnej stronie liści *Ribes rubrum* L., Radyszyn p. Włocławek, VIII.1934.
- 12) *Gymnosporangium juniperinum* L. na liściach *Sorbus aucuparia* L., Jezioro Wikaryjskie p. Włocławek, VIII.1934. Łuba p. Włocławek, VIII. 1934.
- 13) *Melampsora pinitorqua* Rostr. na *Pinus silvestris* L., w zagajniku koło jeziora Wikaryjskiego, p. Włocławek, VIII.1934.
- 14) *Phragmidium fragariastris* (DC) Schroet. na dolnej stronie liści *Potentilla argentea* L., Łuba p. Włocławek, VIII.1934.
- 15) *Phragmidium violaceum* (Schulz.) Winter. na dolnej stronie liści *Rubus fruticosus* L., Ostrowy p. Włocławek, VIII.1934.
- 16) *Puccinia arenariae* (Schum.) Winter. na liściach *Dianthus barbatus*, Włocławek, VIII.1934.
- 17) *Puccinia argentata* (Schulz) Winter. II na liściach *Impatiens nolitangere* L., Dolny Szpetal p. Włocławek, VIII.1934.
- 18) *Puccinia asarina* Kunze na liściach *Asarum europaeum* L., Dolny Szpetal p. Włocławek, VIII.1934.
- 19) *Puccinia balsamitae* (Strauss.) Rabenh. 0, II, III. na liściach i łodyżkach *Tanacetum balsamita*, Włocławek, VIII.1934.
- 20) *Puccinia bardanae* Corda na liściach *Lappa tomentosa*, Włocławek, VIII.1934.
- 21) *Puccinia chondrillae* Corda II na liściach *Lactuca muralis* L., łącznie z *Bremia lactucae* Reg.; Włocławek, VIII.1934.
- 22) *Puccinia graminis* Pers. 0, I na liściach *Berberis vulgaris* L., Włocławek, VIII.1934. Górny Szpetal p. Włocławek, VIII.1934, pomimo zakazu

hodowania berberysu i rozporządzenia o tępieniu tego krzewu, znalazłem w okolicy kilka okazów.

- 23) *Puccinia polygoni* Alb. et Schwein. II i III na liściach *Polygonum convulvulus* L., Włocławek, VIII.1934.
- 24) *Pucciniastrum circaeae* (Schum.) Spegazz. uredo na dolnej stronie liści *Circaea intermedia* Ehrh., Radyszyn p. Włocławek, VIII.1934.
- 25) *Thecopsora vaccinatorum* (Link) Karsten na dolnej stronie liści *Vaccinium myrtillus* L., Józefowo p. Włocławek, VIII.1934.
- 26) *Uromyces pisi* (Pers.) Wint. 0,I na zniekształconych pędach *Euphorbia cyparissias* L., bardzo pospolity w okolicy Włocławka, VIII.1934.

Ascomycetes.

Phacidiales.

- 27) *Rhytisma acerinum* Fr. na liściach *Acer pseudoplatanus* L., Łuba p. Włocławek, VIII.1934. *Acer platanoides* L., Włocławek, VIII.1934.
- 28) *Rhytisma urticae* Fr. na łodygach i ogonkach liściowych *Urtica dioica* L., Radyszyn p. Włocławek, VIII.1934.

Dothideales.

- 29) *Euriachora thoracella* Rustr. na liściach *Sedum maximum* Sut., Łuba p. Włocławek, VIII.1934.

Hypocreales.

- 30) *Polystigma rubrum* (Pers.) DC. w ogromnej ilości na liściach *Prunus domestica* L., Dolny Szpenal p. Włocławek, VIII.1934.

Perisporiales.

- 31) *Erysiphe cichoracearum* DC. na: *Anchusa officinalis* L., Kowal p. Włocławek, VIII.1934. *Echinosperrum lappula* Lehm., Łuba p. Włocławek, VIII.1934. *Pulmonaria officinalis* L., łącznie z *Ramularia cylindroides* Sacc., Dolny Szpenal p. Włocławek, VIII.1934. *Cynoglossum officinale* L., łącznie z *Ovularia farinosa* Bonord., Łuba p. Włocławek, VIII.1934. *Lappa tomentosa*, Włocławek, VIII.1934.
- 32) *Erysiphe galeopsidis* DC. na liściach, łodygach i owocach *Galeopsis tetrahit* L., Włocławek, VIII.1934.
- 33) *Erysiphe pisi* DC. na *Lupinus sativus*, Włocławek, VIII. 1934.
- 34) *Erysiphe polygoni* DC. na *Convolvulus arvensis* L., *Melandrium album* Gke., *Thalictrum flavum*, Włocławek, VIII.1934.
- 35) *Microsphaera alni* (DC) Winter na: *Betula verrucosa* Ehrh., Łuba p. Włocławek, VIII.1934. *Sorbus aucuparia* L., Nadleśnictwo Łuba p. Włocławek, VIII.1934.
- 36) *Microsphaera divaricata* Wallr. na *Rhamnus frangula* L., Radyszyn p. Włocławek, Łuba p. Włocławek, Dolny i Górny Szpenal p. Włocławek, VIII.1934.

- 37) *Microsphaera Ehrenbergii* Lev. na liściach *Lonicera tatarica* L., park we Włocławku, VIII.1934.
- 38) *Podosphaera myrtillina* Kunze na liściach *Vaccinium myrtillus* L., Rybnica p. Włocławek, VIII.1934.
- 39) *Sphaerotheca humuli* (DC) Burr. na liściach *Rubus fruticosus* L., Ostrowy, Rybnica, Wikaryjskie, Dolny Szpenal p. Włocławek, VIII.1934. na *Rubus idaeus* L., Włocławek, VIII.1934.
- 40) *Sphaerotheca pannosa* Wallr. forma workowa na gałązkach i liściach *Rosa spec.*, zarodniki, wygniecione z worków mierzyły 23×14 . Ostrowy p. Włocławek.
- 41) *Uncinula aceris* (DC) Sacc. na liściach *Acer platanoides* L., Włocławek, VIII.1934.

Pyrenomycetes.

- 42) *Coleroa chaetomium* Kunze na liściach *Rubus caesius* L. (czarne plamki na liściach, o średnicy 2—4 mm) Jezioro Wikaryjskie p. Włocławek, VIII.1934.

Fungi imperfecti.

Sphaeropsidales.

- 43) *Leptothyrium alnecum* (Lev) Sacc. na liściach *Alnus glutinosa* Gaertn., Luba p. Włocławek, VIII.1934.
- 44) *Septoria podagrariae* Lasch. na liściach *Aegopodium podagraria* L., Włocławek, VIII.1934.

Melanconiales.

- 45) *Gloeosporium Lindemuthianum* Sacc. et Magn. na strąkach fasoli *Phaseolus vulgaris*, Włocławek, VIII.1934.
- 46) *Gloeosporium ribis* (Lib.) Mont. et Desm. na liściach *Ribes grossularia* L., *Ribes rubrum* L., Włocławek, VIII.1934.

Hyphomycetes.

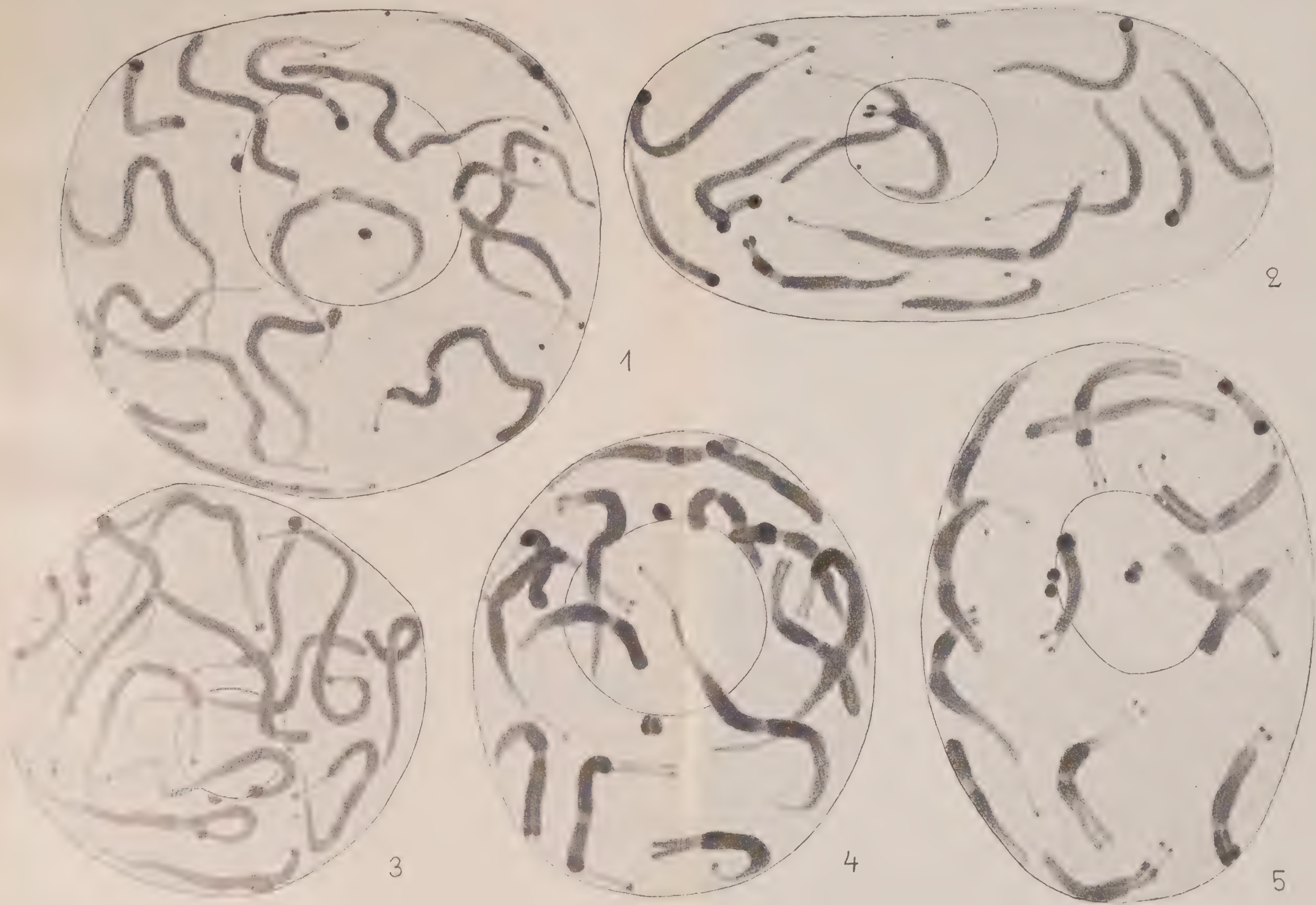
- 47) *Cladosporium herbarum* (Pers.) Lk. na różnych obumierających roślinach. Bardzo pospolite. Włocławek, VIII.1934.
- 48) *Ramularia cylindroides* Sacc. na liściach *Pulmonaria officinalis* L., łącznie z *Erysiphe cichoracearum* DC. Dolny Szpetal p. Włocławek, VIII.1934.
- 49) *Fumago vagans* Pers. na liściach *Saxifraga spec.* w cieplarni, Włocławek, VIII.1934.
- 50) *Fusicladium dendriticum* (Wallr.) Fuck. na liściach, gałązkach i owocach *Pirus malus* L., Włocławek, VIII.1934.
- 51) *Fusicladium pirinum* (Lib.) Fuck. na liściach i owocach *Pirus communis* L., Włocławek, VIII.1934.
- 52) *Heterosporium gracile* (Wallr.) Sacc. na liściach *Iris germanica* L., Włocławek, VIII.1934.

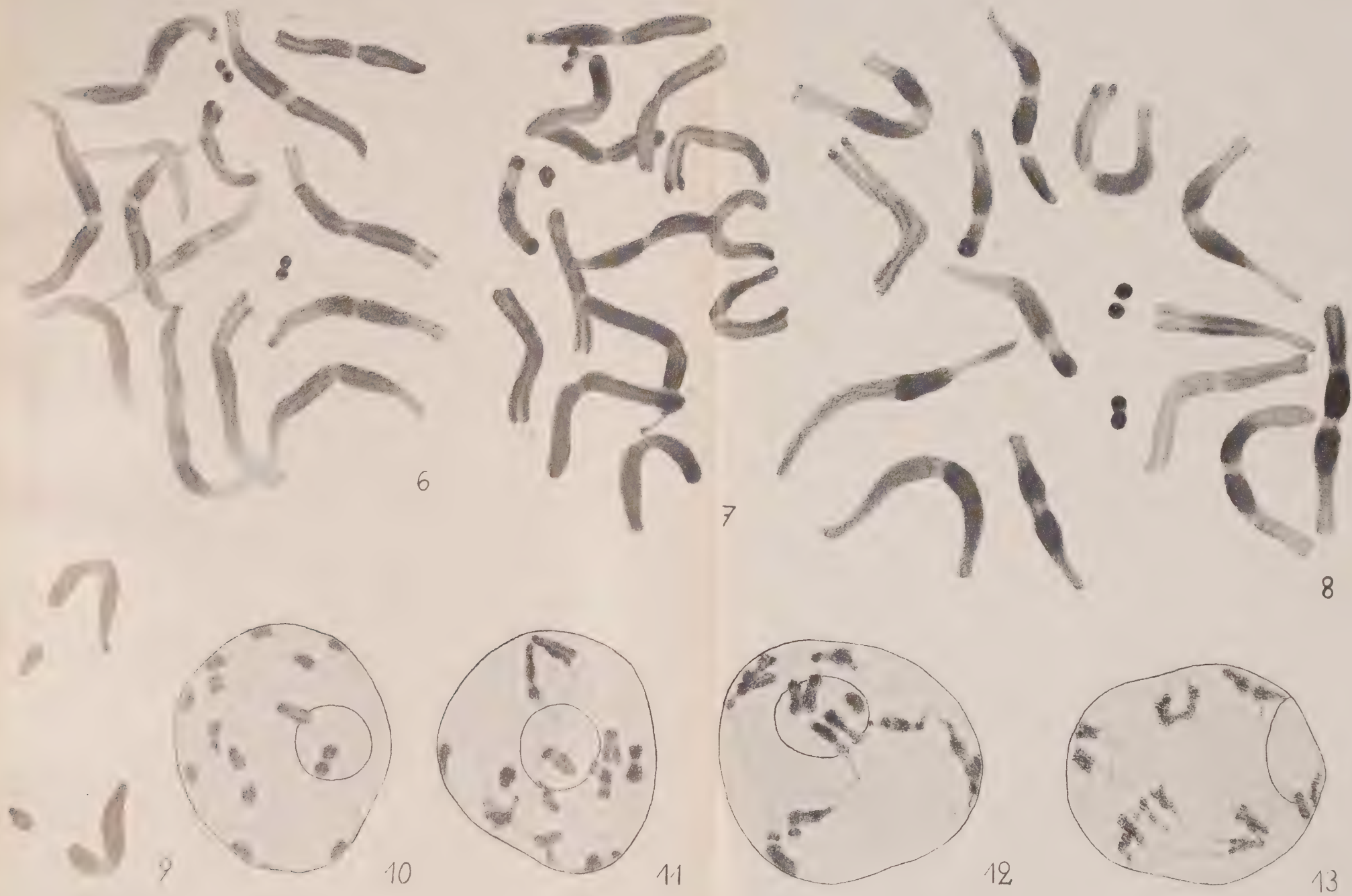
- 53) *Monilia cinerea* Bon. na owocach *Prunus domestica* L., *Prunus cerasus* L., Dolny Szpenal p. Włocławek, VIII.1934.
- 54) *Monilia fructigena* Pers. ogromnie rozpowszechniona na jabłkach, leżących pod drzewami, oraz na wiszących jeszcze na drzewach, z których tworzy mumje. Rzadziej występowała na gruszech. Włocławek, VII, VIII.1934.
- 55) *Oidium alphitoides* Griff. et Maubl. na liściach i młodszych gałązkach *Quercus pedunculata*. Łuba p. Włocławek, VIII.1934. Dolny Szpenal p. Włocławek, VIII.1934 (bardzo obficie).
- 56) *Oidium erysipoides* Fr. na liściach *Plantago major* L., *Cucurbita pepo*, Włocławek, VIII.1934.
- 57) *Oidium fragariae* Harz. na liściach *Rubus idaeus* L., *Rubus fruticosus* L., Jezioro Wikaryjskie p. Włocławek, VIII.1934.
- 58) *Oidium evonymi-japonici* (Arcang.) Sacc. na liściach *Evonymus japonica*. Włocławek, VIII.1934.
- 59) *Ovularia farinosa* Bonord. na liściach *Cynoglossum officinale* L., łącznie z *Erysiphe cichoracearum* DC. Łuba p. Włocławek, VIII.1934.
- 60) *Ramularia Tulasnei* Sacc. bardzo pospolity grzybek na truskawkach (*Fragaria spec.*) w ogrodach okolic Włocławka, VIII.1934.

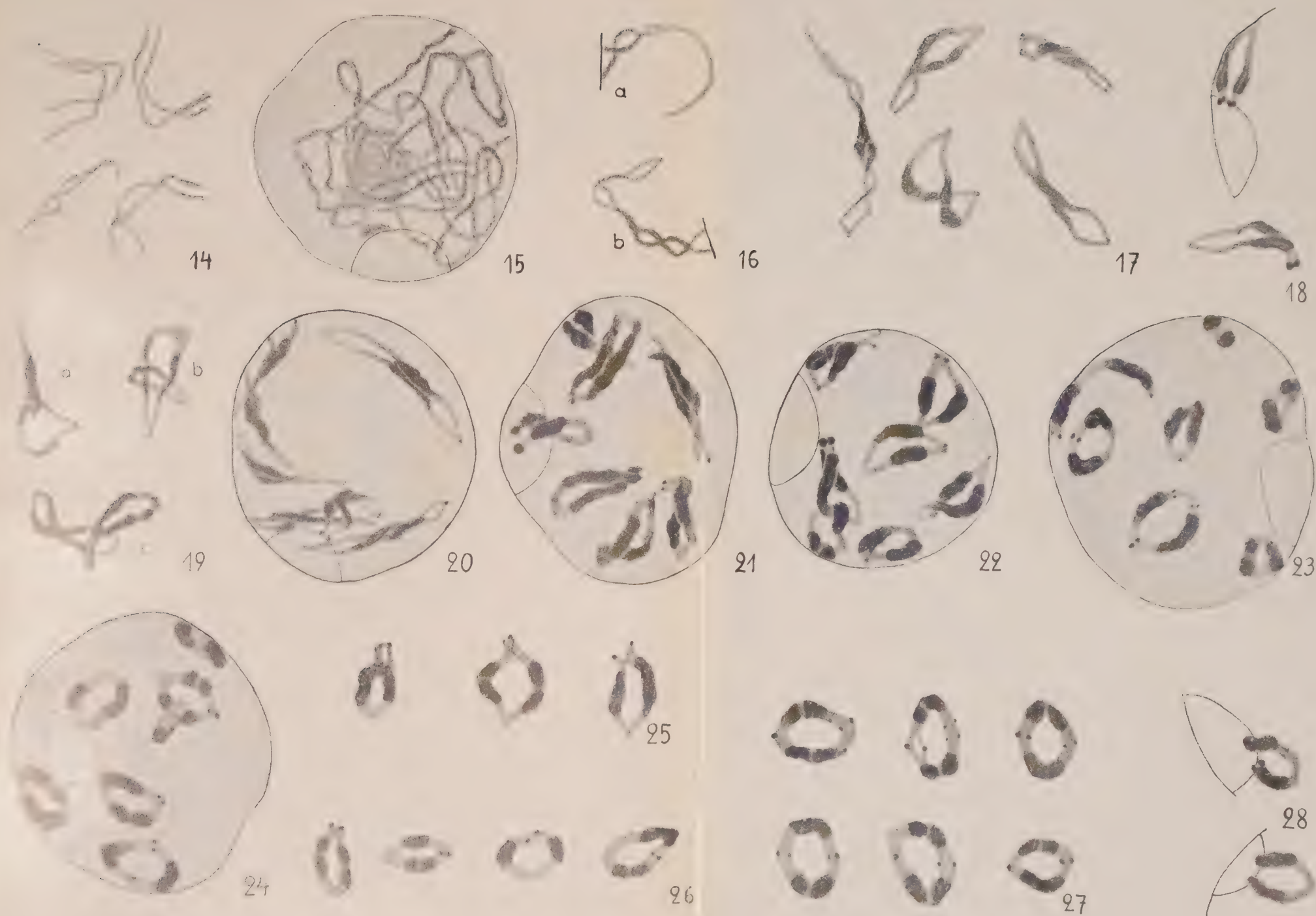
R É S U M É.

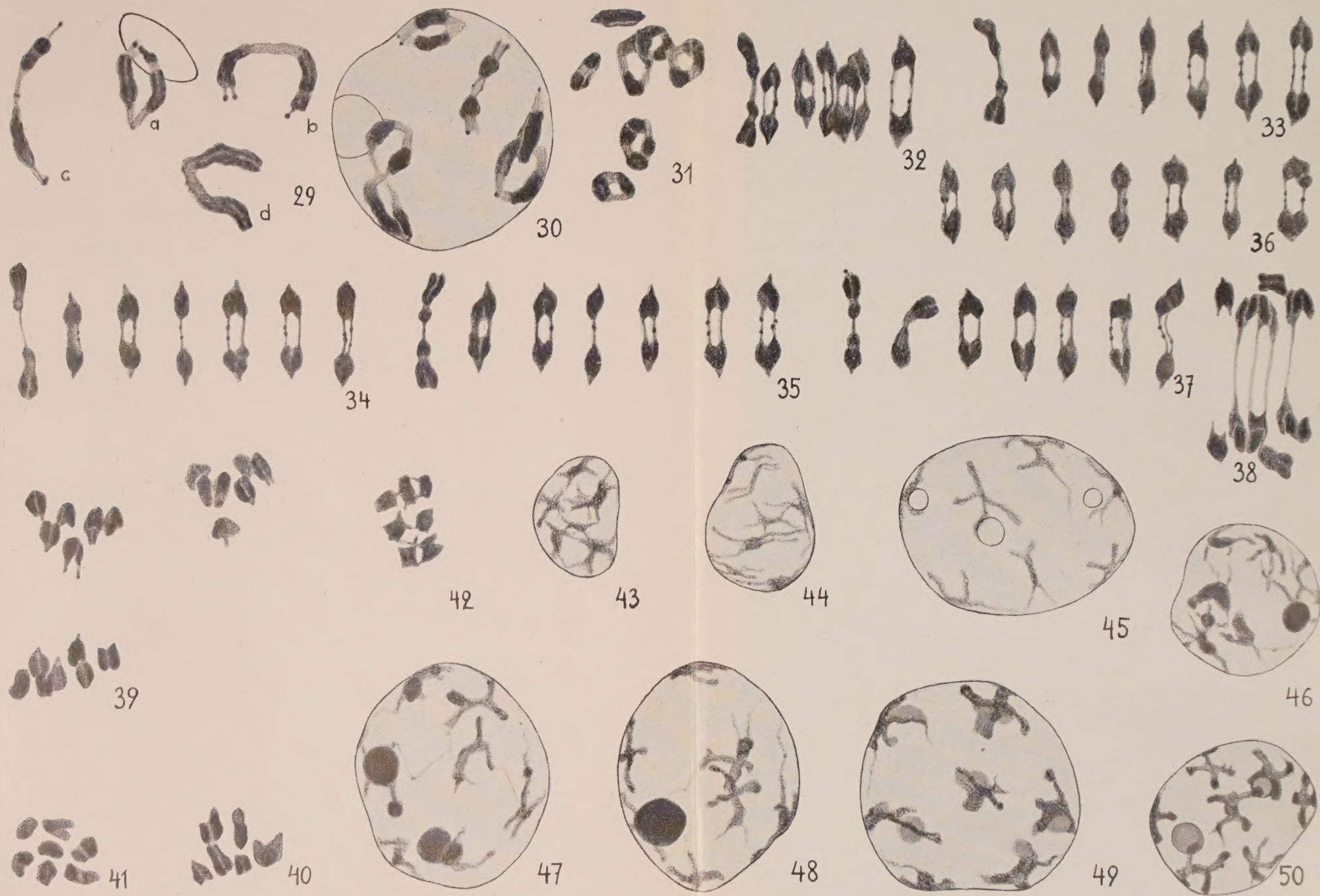
Les champignons qui font l'objet de cette énumération étaient recueillis par l'auteur pendant le mois août 1934 aux environs de Włocławek, Pologne centrale, près de Varsovie.

Institut de Botanique Générale de l'Université de Poznań.











Drukarnia i Litografia
JAN COTTY
w Warszawie, Kapucyńska 7.