

laboratorijsko delo 8

MITOZA V KORENINSKEM VRŠIČKU

1. CILJI VAJE

- priprava citološkega preparata iz koreninskega meristema
- opazovanje faz mitoze
- spoznavanje in razumevanje posameznih faz jedrne delitve
- kvalitativno vrednotenje rezultatov v obliki izrisanih skic
- poglobitev znanja o celični delitvi in ugotavljanje razlik med mitozo živalske in mitozo rastlinske celice
- obvladovanje dela z mikroskopom

2. UVOD

V aktivno rastoči korenini poteka delitev celic v koreninskem vršičku. Če potek mitoze opazujemo pod mikroskopom, razločimo štiri faze mitoze – profazo, metafazo, anafazo in telofazo. Med dvema zaporednima mitozama je jedro v interfazi. Tedaj v jedru potekajo zelo zapleteni procesi, med drugim tudi podvajanje in prepisovanje molekul DNK.

3. MATERIAL

- pripravljen preparat iz koreninskih vršičkov čebule ali šalotke
- barvilo – karminocet
- lanceta, pinceta
- filter papir
- mikroskop, objektna in krovna stekelca

4. METODE DELA

Priprava preparata koreninskega vršička – mečkanca

Na čisto objektno steklce položimo (fiksirano in obarvano) koreninico, ki jo predhodno speremo v vodi. Z lanceto odrežemo 1 – 2 mm konice korenine. S filter papirjem odpivnemo vodo in na vršiček kanemo kapljico karmina. Tkivo razdrobimo na čim manjše koščke (maceriramo) in pokrijemo s krovnim stekelcem. Preko krovnika položimo košček filter papirja in z rahlimi pritiski stisnemo krovnik z objektnikom. Tako pripravljen preparat pregledamo pod mikroskopom.

Pod mikroskopom poiščemo na preparatu celice v interfazi (I), profazi (P), metafazi (M), anafazi (A) in telofazi (T) pri 400x povečavi in izrišemo skice posameznih faz delitve.

Nato preštajemo celice v posameznih fazah v treh vidnih poljih, kjer so celice enakomerno gosto razporejene (npr. 50 celic na vidno polje). Katerih celic je največ in kaj to pomeni?

Potem izračunamo delež celic v mitози glede na število vseh opazovanih celic v pregledanih vidnih poljih. To je mitotski indeks (MI), ki ga izražamo v %. Kaj nam pove MI in kaj lahko sklepamo na osnovi njegove večje ali manjše vrednosti?

5. REZULTATI

- skica 1: Profaza mitoze
- skica 2: Metafaza mitoze
- skica 3: Anafaza mitoze

skica 4: Telofaza mitoze

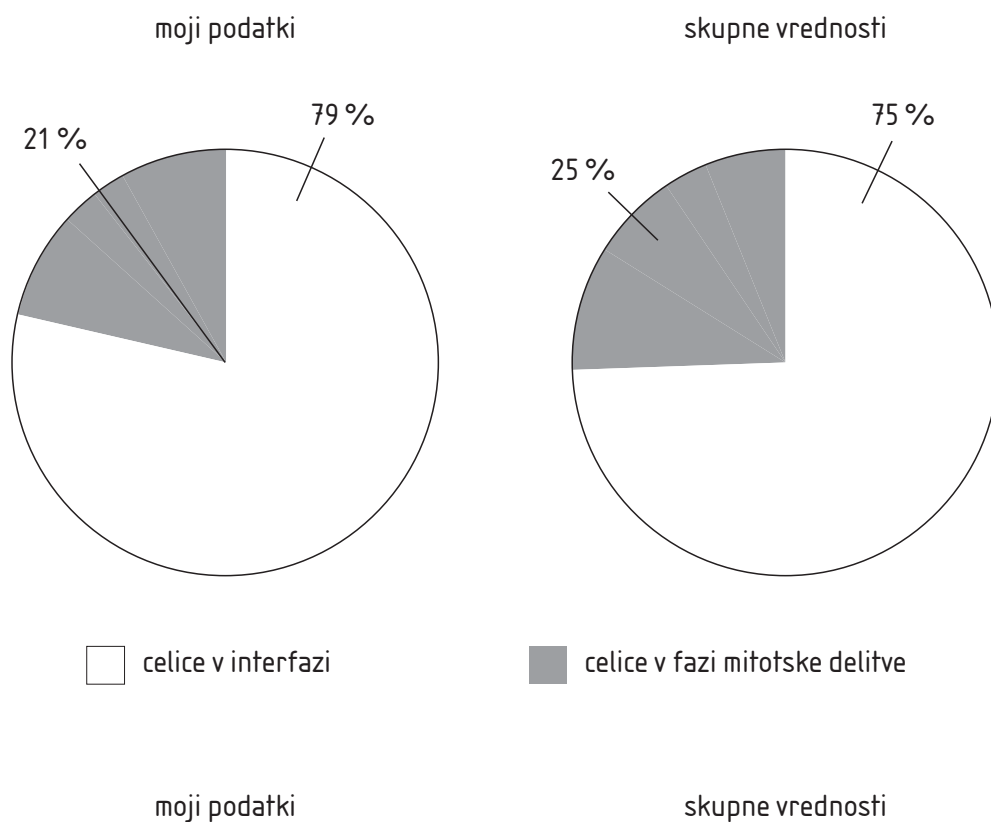
skica 5: Interfaza

Glej prilogo 1.

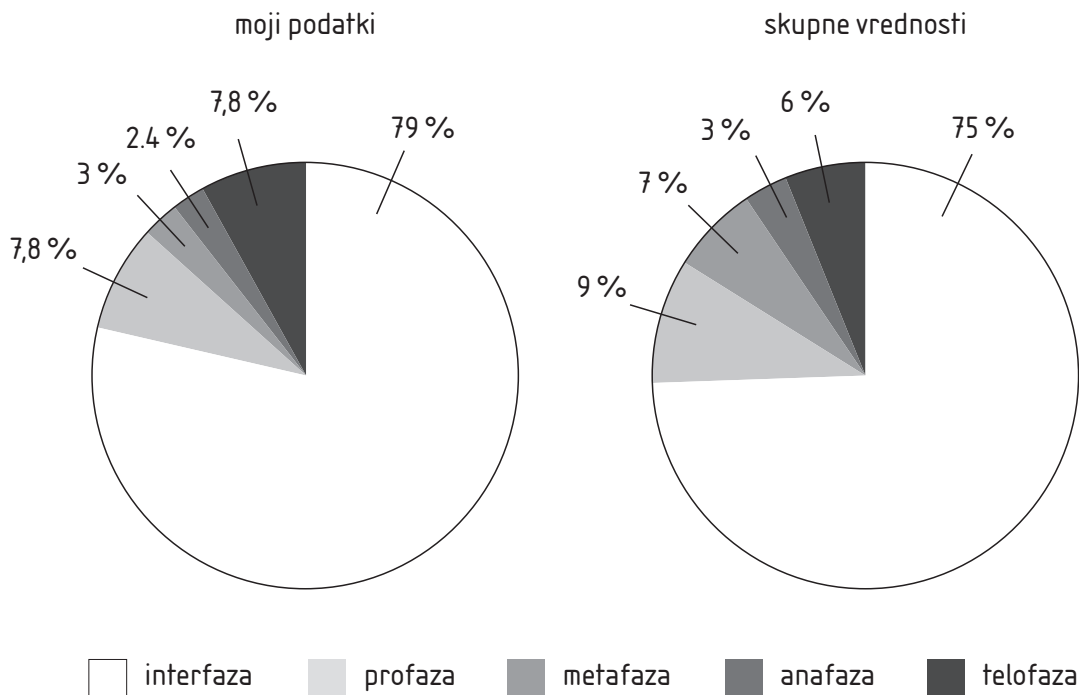
tabela 1 – Število celic v posamezni fazi mitoze in mitotski indeks

oseba	število celic	I	P	M	A	T	MI	MI (%)
Maja	165	130	13	5	4	13	35	21
Tadej	155	100	20	15	10	10	55	35
Samo	180	157	10	5	3	5	23	13
Urša	199	107	39	17	12	24	92	46
Mitja	165	100	20	15	13	17	65	40
Nina	170	135	17	8	3	7	35	21
Rok	200	163	10	7	7	13	37	18
Katja	283	238	9	24	3	9	45	16
Vid	151	98	24	16	3	10	53	23
Mojca	204	170	3	24	2	5	34	17
Živa	200	141	27	10	7	15	59	30
Petra	146	117	13	6	7	3	29	20
skupaj	2218	1656	205	152	74	131	562	25

graf 1 – Mitotski indeks



graf 2 – Odstotek celic v posamezni fazi



6. DISKUSIJA

Razmnoževanje evkariontskih celic je zapleten proces. Vključuje delitev jedra in delitev citoplazme. Dedne informacije se podvojijo, nato pa se, razdelijo na hčerinske celice. Delitev, s katero nastanejo dve identični hčerinski celici, ki sta po kvaliteti in količini dednega materiala enaki materinski, imenujemo mitozo.

Če si želimo ogledati mitotsko delitev, moramo najprej s fiksacijo ustaviti vse procese, ki potekajo v celicah. Z mitozo se v živalskih celicah razmnožujejo telesne celice (somatske celice), pri rastlinah pa le celice v zarodnih tkivih – zato smo uporabili preparat iz koreninskega vršička. Te celice so diploidne (imajo parno število kromosomov).

Mitoza poteka v več zaporednih fazah. Te stopnje delitve imenujemo profaza, metafaza, anafaza in telofaza. Med dvema zaporednima mitozama je celica v fazi rasti, ki jo imenujemo interfaza.

V profazi (skica 1) se kromatinske niti v jedru začno spiralizirati in debeliti. Nastanejo kromosomi, sestavljeni iz dveh kromatid, ki se stikata v centromeru. Vsako kromatido tvori ena molekula DNK. V celicah, kjer so prisotni centrioli (v živalskih celicah), se centriola podvojita in vsak par centriolov odpotuje k svojemu polu. Blizu centriolov se v citoplazmi začnejo oblikovati mikrotubuli – niti delitvenega vretena, ki se podaljšujejo proti nasprotnemu polu. V pozni profazi jedrni ovoj razpade na membranske mešičke. Niti delitvenega vretena podaljšajo do kromosomov in se nanje pritrdijo v centromerih. Na vsak kromosom se pritrdijo niti z obeh polov. V pozni profazi postopoma izgine tudi jedrce.

Mi večine tega procesa nismo videli, videli nismo niti struktur, ki sodelujejo pri delitvi, saj je imel svetlobni mikroskop, ki smo ga pri delu uporabljali, premajhno ločljivost in povečavo. Profazo smo spoznali po tem, da so bili kromosomi tanki, dolgi in "razpršeni" po vsem jedru.

V metafazi (skica 2), ki sledi profazi, niti delitvenega vretena povlečejo kromosome v ekvatorialno ravnino. Zaradi značilne lege kromosomov, metafazo pri opazovanju zlahka ločimo od drugih faz mitoze. V tej fazi so kromosomi najdebeleši in najkrajši, zato jih je najlažje prešteti.

To fazo mitoze je bilo zaradi značilne lege kromosomov najlažje razpoznati.

Naslednjo fazo mitoze imenujemo anafaza (skica 3). V anafazi se kromatidi dokončno ločita. Dvokromatidni kromosomi se razdelijo v dva enokromatidna kromosoma, ki ju niti delitvenega vretena povlečejo na nasprotna pola.

Tudi anafazo pri opazovanju zlahka ločimo od sotalih faz mitoze, saj so kromatide "pakupčkane" na dveh polih celice. Razdalja med "kupčkoma" je odvisna od tega, v katerem stadiju anafaze smo celico fiksirali.

Naslednja faza, telofaza (skica 4), se začne, ko so kromosomi na nasprotnih polih celice. Dogajanje v telofazi je nasprotno dogajanju v profazi. Delitveno vreteno postopoma izgine, okrog vsakega skupka kromosomov se oblikuje jedrni ovoj, kromosomi se tanjšajo in despiralizirajo, nastanejo kromatinske niti, znotraj jedra se oblikuje jedrce. Telofazo pri opazovanju od profaze ločimo po tem, da v celici lahko opazimo celično ploščo, ki bo razdelila citoplazmo.

To fazo je bilo težje razpoznati, saj sta celici v pozni telofazi že praktično ločeni in na pogled je stanje zelo podobno tistemu v profazi. Vseeno smo celice v telofazi od tistih v profazi lahko ločili po celični plošči, ki nastaja na sredini deleže se celice.

Ko se celična delitev zaključi, hčerinski celici preideta v interfazo – fazo celične rasti. Interfazo razdelimo na več stopenj. V interfazi v celici poteka intenzivna sinteza snovi, podvajanje dednega materiala in celica se s kopičenjem ATP pripravi na novo mitotsko delitev. Pri nekaterih celicah interfazi sledi nova delitev celice, druge pa se ne delijo več in ostanejo v tej fazi.

Celica se deli relativno malo časa svojega obstoja. V našem primeru je 79 odstotkov celičnega cikla predstavljala interfaza (graf 1), le 21 odstotkov časa je bila celica v fazi delitve. Delitve potečejo relativno hitro. Cepitev bakterij (prokariotskih celic) lahko poteče že v 15 minutah, delitev evkariontske celice pa traja nekaj ur. Od faz mitoze najdlje traja telofaza, najkrajša pa je anafaza. To je razvidno tudi iz podatkov, ki smo jih zbrali – graf 2. Sama sem sicer opazila enako število celic v profazi in telofazi, vendar je zaradi podobnega izgleda lahko prišlo do napake. Najmanj celic sem opazila v anafazi, kar se ujema s podatki iz literature.

7. ZAKLJUČEK

Najlažje je bilo prepoznati celice v metafazi in anafazi, nekoliko več težav smo imeli z razpoznavanjem interfaze, profaze in telofaze (predvsem slednjih dveh), zato naši podatki niso povsem relevantni. Do napak je lahko prišlo tudi pri štetju celic.

8. LITERATURA

Srdjan Bavdek, Citologija z osnovami citogenetike za študente veterinarstva. Biotehniška fakulteta, VTOZD za veterinarstvo, Ljubljana. 1984.

Jože Drašler, Nada Gogala, Meta Povž, Franc Sušnik, Tatjana Verčkovnik in Branko Vesel, BIOLOGIJA – Navodila za laboratorijsko delo. DZS, Ljubljana. 2005.

Gerald C. Karp, Cell and molecular biology: concepts and experiments. J. Wiley & Sons, New York. 2004.

W. R. Pickering, Biologija. Shematski pregledi. Tehniška založba Slovenije, Ljubljana. 1996.

Andrej Podobnik in Dušan Devetak, Biologija: Raznolikost živih bitij. DZS, Ljubljana. 2005.

Peter Stušek, Andrej Podobnik in Nada Gogala, Biologija 1, Celica. DZS, Ljubljana. 1998.