Wpływ obniżonej temperatury na włączanie adeniny- ^{14}C , fenyloalaniny- ^{14}C i tymidyny- ^3H do komórek merystemu korzeniowego *Vicia faba*

*Influence de la basse température sur l'incorporation d'adénine- ^{14}C ,
de phénylalanine- ^{14}C et de thymidine- ^3H dans les cellules du méristème
radiculaire de *Vicia faba**

M. J. OLSZEWSKA i B. RODKIEWICZ

W komórce roślinnej znajdującej się w środowisku o obniżonej temperaturze procesy życiowe ulegają zwolnieniu. Nie wszystkie one reagują w tym samym stopniu, toteż przebieg jednych zjawisk może być silniej dotknięty niż innych. Np. obniżona temperatura hamuje podziały komórkowe, nie hamując jednocześnie w pełni syntezy DNA (kwasu dezoksyrybonukleinowego) (R o d k i e w i c z 1961). W pewnych przypadkach same chromosomy w partiach euchromatynowych i heterochromatynowych zachowują się odmiennie (L a C o u r 1952).

Celem prześledzenia trzech stosunkowo łatwo uchwytnych procesów: syntezy RNA (kwasu rybonukleinowego), białek i DNA, w pracy tej wykorzystano metodę autoradiografii, pozwalającej na ilościowe porównywanie wyników. Procesy syntezy i transportu RNA bezpośrednio wiążą się z syntezą białek; w komórkach dzielących się mitotycznie, synteza DNA — obok poprzednich procesów — jest warunkiem koniecznym pojawienia się kariokinezy.

Można się było spodziewać, że w obniżonej temperaturze zachodzi pewne rozprzężenie zjawisk normalnie ze sobą związanych. W rezultacie zakłóceń, częściowo odizolowane procesy metaboliczne staną się łatwiejsze do obserwowania. W trakcie doświadczeń okazało się, że podczas pierwszych dni chłodzenia włączanie prekursorów RNA i DNA do jądra pozostaje na dosyć wysokim poziomie, a nowo syntetyzowany RNA gromadzi się, przynajmniej częściowo, w jądrze. Tymczasem synteza białek w jądrze spada gwałtownie. W cytoplazmie spada zarówno ilość znakowanego RNA, jak i białek. W rezultacie zwykła proporcja pomiędzy znakowanym RNA jądra i cytoplazmy zostaje przesunięta na korzyść jądra. Po przywróceniu normalnych warunków temperatury, znakowany RNA jądra przenosi się do cytoplazmy i komórka wraca do poprzedniego stanu równowagi.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzano na merystemie bocznych korzeni *Vicia faba*. Młode rośliny hodowano w wodzie wodociągowej, w temperaturze 18°C, a następnie przenoszono do chłodni, do temperatury 4°C. Część roślin pozostawała w temperaturze 18°C i stanowiła materiał kontrolny. Korzenie utrwalano w mieszaninie alkoholu absolutnego i kwasu octowego lodowatego (3:1). Skrawki parafinowe grubości 4 μ (w przypadku prekursora piętnowanego ^3H) lub 8 μ (prekursory piętnowane ^{14}C) pokrywano płynną emulsją Ilford G5 według metody Ficq (1955). W pewnych przypadkach sporządzano preparaty gniecione, macerując stożki wzrostu przez 5 min. 1N HCl w temperaturze pokojowej. Autoradiogramy po wywołaniu barwiono mieszaniną Unny. Niektóre preparaty trawiono rybonukleazą krystaliczną (Armour), stosowaną w koncentracji 0,1 mg/ml w buforze TRIS (pH 7,2) przez 2 godz. w temp. 37°C.

Przeprowadzono następujące doświadczenia:

1. Rośliny chłodzone przez 1, 2, 3 i 4 dni w temp. 4°C inkubowano w ciągu 24 godz. w tej samej temperaturze w roztworze tymidyny- ^3H (0,66 μC i 0,013 $\mu\text{M}/\text{ml}$), adeniny-8- ^{14}C (0,13 μC i 0,025 $\mu\text{M}/\text{ml}$), lub dl-fenyloalaniny-2- ^{14}C (0,155 μC i 0,06 $\mu\text{M}/\text{ml}$). Materiał kontrolny był inkubowany przez 24 godz. w temperaturze 18°C. Czas ekspozycji wynosił dla materiału inkubowanego z tymidyną 5 dni, z adeniną — 2 dni, z fenyloalaniną — 4 dni.

2. Rośliny chłodzone przez 4 dni inkubowano w chłodni przez 15, 30 i 60 min. z adeniną-8- ^{14}C (1,3 μC i 0,25 $\mu\text{M}/\text{ml}$). Rośliny kontrolne były inkubowane w identyczny sposób w temp. 18°C. Czas ekspozycji wynosił od 3 do 26 dni; wyniki w tabelach zostały przeliczone na 6 dni ekspozycji.

3. Rośliny chłodzone przez 3 dni inkubowano w chłodni przez 24 godz. z adeniną-8- ^{14}C (0,13 μC i 0,025 $\mu\text{M}/\text{ml}$) lub z dl-fenyloalaniną-2- ^{14}C (0,155 μC i 0,06 $\mu\text{M}/\text{ml}$). Następnie rośliny przeniesiono do temp. 18°C i inkubowano przez 1, 3, 8 i 24 godz. z adeniną lub fenyloalaniną nieradioaktywną. Czas ekspozycji wynosił 2 dni dla korzeni inkubowanych z adeniną, 4 dni — dla materiału inkubowanego z fenyloalaniną.

4. Rośliny chłodzone przez 3 dni inkubowano również w temp. 4°C przez 2 godz. z adeniną-8- ^{14}C (1,3 μC i 0,25 $\mu\text{M}/\text{ml}$), po czym pozostawiano je na dalsze 22 godz. w tej samej temperaturze; w sumie czas chłodzenia wynosił więc 4 dni. Następnie część korzeni utrwalano, resztę materiału przenoszono do temp. 18°C i korzenie utrwalano po 1, 3 i 5 godz. Czas ekspozycji wynosił 24 godz.

Stosowana przez nas metoda autoradiograficzna pozwala na ilościowe przedstawienie wyników w odniesieniu do jądra, jąderka i cytoplazmy.

Przy użyciu prekursorów znakowanych ^3H uzyskuje się bardzo precyzyjną lokalizację w postaci pojedynczych ziaren, ponieważ energia cząstek β emanowanych przez ten izotop jest słaba (0,017 MeV). Cząstki β ^{14}C charakteryzują się większą energią (0,155 MeV), dzięki czemu powstają tzw. ślady wskutek zaktywowania szeregu ziaren emulsji. Cząstki β stopniowo wytracają energię; powstaje łańcuch ziaren bardziej oddalonych od siebie na początku toru cząstki β i zgęszczających się przy końcu. Pozwala to na dokładne określenie punktu wyjścia cząstek β ^{14}C . Przyjmowano (wg Ficq 1955) za „ślad” łańcuszek złożony z co najmniej 4 ziaren. Warto dodać, że stosowana przez nas metoda płynnej emulsji redukuje do minimum błąd powstający wskutek oddalenia emulsji od tkanki radioaktywnej; w przeciwieństwie do metody zw. „stripping film”, płynna emulsja przylega dokładnie do powierzchni skrawków.

Błąd w obliczeniach ilości śladów na autoradiogramach wynosi co najmniej 40%, jednak przy zbyt dużej ich ilości na preparatach zwiększa się i dochodzi do 100% (Ficq 1959). Z tego względu, celem uzyskania optymalnej ilości śladów, autoradiogramy były ekspozowane na rozmaity przeciąg czasu — w zależności od radioaktywności skrawków. Ta ostatnia zależy: od koncentracji w środowisku znakowanego prekursora, od czasu inkubacji i wreszcie od rodzaju doświadczenia. Liczba śladów na autoradiogramach wzrasta wprost proporcjonalnie od upływu czasu ekspozycji. Aby uzyskać wyniki porównywalne, dane przedstawione na tabelach były przeliczone na ten sam czas ekspozycji. Obliczeń ilości śladów przeprowadzano co najmniej w 100 komórkach.

WYNIKI

Włączanie adeniny- ^{14}C

Porównywano liczby śladów na autoradiogramach wierzchołków korzeni roślin chłodzonych 1—4 dni w temp. 4°C i roślin kontrolnych, tj. hodowanych w temp. 18°C . Przy ocenie radioaktywności komórek oddzielnie określano radioaktywność jąderka, jądra i cytoplazmy. Jak można było się spodziewać, włączanie radioaktywnego prekursora obniża się bardzo wyraźnie w miarę przedłużania chłodzenia (tabela 1). Rośliny inkubowane z adeniną- ^{14}C przyłączały ją przeszło 6-krotnie słabiej po 4 dniach chłodzenia niż rośliny kontrolne. Jednak zdolność przyłączania adeniny zmienia się niejednakowo w trzech obserwowanych częściach komórki. Podczas pierwszych 2 dni chłodzenia przyłączanie adeniny do jądra i jąderka pozostaje na takim samym, a nawet wyższym poziomie niż w roślinach kontrolnych. Cytoplazma tymczasem staje się mniej radioaktywna i cały spadek ogólnej radioaktywności komórek odbywa się jej kosztem. W rezultacie względny udział jądra i jąderka w całko-

T a b e l a 1 - T a b l e a u 1

Wpływ chłodzenia na włączanie adeniny- ^{14}C do komórek merystemu korzeniowego Vicia faba
 Influence de la basse température sur l'incorporation d'adénine- ^{14}C
 dans les cellules du méristème racinaire de Vicia faba

Liczba dni w 4°C Durée de pré- traitement à 4°C /jours/	Jąderko Nucéole		Jądro Noyau		Cytoplasma Cytoplasme		Razem Total	
	liczba śladów nombre de traces	% radioaktywności całkowitej % totale	liczba śladów nombre de traces	% radioaktywności całkowitej % totale	liczba śladów nombre de traces	% radioaktywności całkowitej % totale	liczba śladów nombre de traces	% radioaktywności całkowitej % totale
0 /kontrola - temoin/	111	6	508	27	1275	67	1894	100
1	105	9	594	52	453	39	1152	100
2	142	16	435	47	338	37	915	100
3	67	17	188	49	132	34	387	100
4	67	24	127	47	80	29	274	100

witej radioaktywności ulega zwiększeniu. Dopiero w 3 i 4 dniu chłodzenia bezwzględna radioaktywność jądra i jąderka obniża się odpowiednio do 1/4 i 1/2 w porównaniu z kontrolą, podczas gdy radioaktywność cytoplazmy spada do 1/15.

Jak wynika z przytoczonych danych, procesy włączania adeniny do kario- i cytoplazmy w niejednakowym stopniu reagują na obniżoną temperaturę. Ogólnie zaobserwowana tendencja polega na zwiększeniu względnej ilości włączanej adeniny do jądra i jąderka i obniżeniu włączania adeniny do cytoplazmy.

Istnieją dwie możliwości objaśnienia tego zjawiska: 1) proces włączania adeniny do cytoplazmy silniej reaguje na obniżoną temperaturę niż proces włączania tego związku do jądra; 2) pierwotnym miejscem włączania adeniny jest jądro, a obniżona temperatura hamuje transport radioaktywnego RNA z jądra do cytoplazmy.

O ile procesy przyłączania adeniny, odbywające się w jądrze i w cytoplazmie, charakteryzują się niejednakową wrażliwością na temperaturę, to w takim razie zmniejszenie radioaktywności cytoplazmy wskazywałoby na większą wrażliwość tych procesów w cytoplazmie niż w jądrze. Ponieważ adenina może się włączać do DNA i RNA, to nasuwałoby się przypuszczenie, że mniejsza wrażliwość jądrowego mechanizmu włączania prekursora wynika właśnie z faktu dwutorowości tego procesu w jądrze. W istocie, udział adeniny przyłączonej do DNA stanowi 37% całkowitej radioaktywności jąder roślin kontrolnych. Stwierdzono to traktując rybonukleazą odpowiednie preparaty (tabela 2).

Po 4 dniach chłodzenia udział adeniny włączanej do DNA stanowi tylko 8% całej radioaktywności jąder. Intensywność włączania adeniny

T a b e l a 2 - T a b l e a u 2

Włączanie adeniny- ^{14}C do DNA wyrażone w % całkowitej radioaktywności jąder
Incorporation de l'adénine- ^{14}C dans l'ADN exprimée en % d'activité totale des noyaux

Liczba dni w 4°C Durée de prétraitement à 4° /jours/	% radioaktywności całkowitej jąder % d'activité totale des noyaux
0	37
1	24
2	10
3	9
4	8

do DNA spada w większym stopniu niż intensywność włączania adeniny do RNA. Obserwacje dotyczące włączania adeniny do DNA przy obniżonej temperaturze zgadzają się z obserwacjami włączania tymidyny w takich samych warunkach (spadek do minimum, omówiono dalej). Jeśli weźmiemy pod uwagę jedynie włączanie adeniny do RNA jądra i RNA cytoplazmy, to pod wpływem obniżonej temperatury wzrost względnej ilości adeniny włączonej do jądrowego RNA zwiększy się jeszcze bardziej niż przy porównywaniu całkowitego włączania adeniny do jądra i cytoplazmy. Proces przyłączania adeniny do RNA jądrowego byłby więc mniej wrażliwy na obniżenie temperatury niż tenże sam proces odbywający się w cytoplazmie.

Istnieje wiele danych w literaturze wskazujących na jąderko i jądro jako na pierwotne i główne miejsca przyłączania prekursorów RNA oraz jego syntezy (Goldstein i Micou 1959a i b; Sirlin i Elsdale 1959; Woods 1959; Amano i Leblond 1960; Feinendegen i in. 1960; Perry 1960; Sirlin 1960; McMaster-Kaye 1960; Perry i in. 1961; Olszewska i in. 1961; ref. Olszewska 1962). Nowo utworzony RNA ma być następnie odtransportowany do cytoplazmy. Jeśli przyjąć przytoczoną hipotezę, to w opisywanym doświadczeniu proces transportu radioaktywnego RNA z jądra do cytoplazmy został zahamowany w większym stopniu niż proces włączania prekursora do RNA. Porównanie liczby śladów ^{14}C adeniny w kario- i cytoplazmie podczas pierwszych 2 dni chłodzenia wydaje się zgadzać wyraźnie z proponowaną interpretacją; pomimo obniżenia temp. o 14° , ilość włączonego do jądra prekursora pozostawała nie zmniejszona. Trudno przypuścić, że włączanie adeniny do RNA jądra jest przez 48 godz. nie tylko niewrażliwe na obniżoną temperaturę, a nawet nieznacznie stymulowane. Można więc przypuścić, że zmiany we względnym rozmieszczeniu materiału znakowanego wynikają z hamującego działania obniżonej temperatury na transport tego materiału (RNA) z jądra do cytoplazmy.

Na przechodzenie RNA z jądra do cytoplazmy mogą wskazywać doświadczenia z krótkimi czasami inkubacji w temperaturze normalnej. Wówczas rozmieszczenie materiału radioaktywnego jest podobne jak w komórkach roślin chłodzonych (tabela 3). W korzeniach inkubowanych 15 min. z radioaktywną adeniną rozmieszczenie znakowanego prekursora było prawie identyczne jak w materiale utrzymywanym przez 4 dni w temp. 4°C (por. tabela 1). Po przedłużeniu inkubacji do 30 i 60 min., ilość prekursora w preparatach wzrasta i jego względne rozmieszczenie zostaje zmienione. Stopniowo zmniejsza się względny udział jądra i jąderka w ogólnej radioaktywności komórki — od 68% po 15 min. inkubacji do 46% po 60 min. inkubacji. W analogicznym doświadczeniu, przeprowadzonym w temp. 4° na materiale chłodzonym uprzednio przez 4 dni, stwierdza się przez cały czas przewagę włączania adeniny do

Tabela 3 - Tableau 3

Wpływ chłodzenia na włączanie adeniny- ^{14}C do komórek
merystemu korzeniowego *Vicia faba*.

Influence de la basse température sur l'incorporation d'adénine- ^{14}C
dans les cellules du méristème racinaire de *Vicia faba*.

Czas trwania inkubacji Durée d'incu- bation	Rodzaj doś- wiadczenia Traitement	Liczba śladów - Nombre de traces			
		jąderko nucléole	jądro noyau	cytoplasma cytoplasme	razem total
15 min.	kontrola témoin	156 = 24%	288 = 44%	212 = 32%	656 = 100%
	4 dni w 4° 4 jours à 4°	25 = 24%	62 = 59%	18 = 17%	105 = 100%
30 min.	kontrola témoin	113 = 13%	352 = 39%	433 = 48%	898 = 100%
	4 dni w 4° 4 jours à 4°	57 = 30%	77 = 41%	55 = 29%	189 = 100%
60 min.	kontrola témoin	416 = 9%	1656 = 37%	2372 = 54%	4444 = 100%
	4 dni w 4° 4 jours à 4°	159 = 24%	291 = 45%	201 = 31%	651 = 100%

jądra i jąderka (tabela 3). Należy zaznaczyć, że celem uzyskania wymiernej ilości śladów na preparatach, w doświadczeniach z krótkim czasem inkubacji użyto roztworu adeniny- ^{14}C o 10-krotnie większej radioaktywności niż w doświadczeniu poprzednim. Stąd też stosunkowo wysoka radioaktywność preparatów, pomimo krótkiego czasu inkubacji.

Rośliny chłodzone przez 3 dni inkubowano następnie przez 24 godz. w tej samej temperaturze z adeniną- ^{14}C , a potem przenoszono je do temperatury pokojowej, do środowiska z adeniną nie znakowaną. Pomimo braku adeniny- ^{14}C w środowisku, radioaktywność preparatów z roślin utrzymywanych w pokojowej temperaturze ulegała podwyższeniu o około 1/4 w ciągu pierwszych 3 godz. i utrzymywała się przez kilka godzin na stałym poziomie. Po 24 godz. spadała do połowy w porównaniu z aktywnością maksymalną (tabela 4). W roślinach chłodzonych musiała się wobec tego nagromadzić pewna ilość kwasorozpuszczalnych połączeń adeniny. Te związki zostały wypłukane podczas utrwalania korzeni pobranych w 1 godz. po przeniesieniu do temp. 18° . Po 3 godz. przebywania roślin w temp. 18° , adenina w niskocząsteczkowych związkach uległa włączeniu do związków wysokocząsteczkowych i ujawniła się w autoradiogramach. Początkowo rozmieszczenie znakowanej adeni-

ny jest takie jak w poprzednich doświadczeniach z obniżoną temperaturą. Po przeniesieniu roślin do temperatury pokojowej, zmniejsza się względny udział jądra i jąderka w całkowitej radioaktywności komórki (tabela 4).

Jeśliby roślinom podać prekursor w ciągu 3 dnia chłodzenia, a następnie pozostawić je na prawie całą dobę w temp. 4° w środowisku bez prekursora, to można by się spodziewać całkowitego włączenia niskocząsteczkowych związków adeniny, a także wolnej adeniny, do kwasów nukleinowych komórki. Wtedy, w momencie przenoszenia do podwyższonej temperatury, cała adenina radioaktywna byłaby w wysokocząsteczkowych, nierozpuszczalnych w utrwalaczu związkach, znajdujących się przede wszystkim w jądrze i w jąderku. W doświadczeniu tym porównywano radioaktywność komórek z korzeni utrwalonych w momencie przenoszenia roślin z temp. 4° do temp. 18° (czas 0) i w 1, 3, 5 godzin przebywania w temp. 18°. Radioaktywne związki w czasie 0 były wyraźnie zgrupowane w jądrze i w jąderku (tabela 5, fig. 1), co jest zgodne z poprzednimi doświadczeniami. Pozostawał jednak nadal w ko-

T a b e l a 4 - T a b l e a u 4

Zlokalizowanie śladów ^{14}C adeniny w merystemie korzeniowym roślin chłodzonych przez 3 dni w 4°, następnie inkubowanych 24 godz. z adeniną- ^{14}C w 4°, po czym przeniesionych do adeniny- ^{12}C , do temp. 18°. Localisation des traces dans les cellules du méristème racinaire des plantes prétraitées 3 jours à 4°, ensuite incubées pendant 24 heures avec l'adénine- ^{14}C et transférées à 18° au milieu contenant de l'adénine- ^{14}C .

Czas trwania inkubacji z adeniną- ^{12}C w 18° Durée d'incubation avec adénine- ^{12}C à 18°	Liczba śladów - Nombre de traces			
	jąderko nucléole	jądro noyau	cytoplasma cytoplasme	razem total
1 godz. 1 heure	95 = 10%	511 = 52%	373 = 38%	979 = 100%
3 godz. 3 heures	94 = 8%	418 = 33%	738 = 59%	1250 = 100%
8 godz. 8 heures	42 = 4%	370 = 30%	802 = 66%	1214 = 100%
24 godz. 24 heures	18 = 3%	156 = 26%	426 = 71%	600 = 100%

T a b e l a 5 - T a b l e a u 5

Zlokalizowanie śladów w komórkach merystemu korzeniowego roślin chłodzonych przez 4 dni, inkubowanych z adeniną- ^{14}C w ciągu trzeciego dnia chłodzenia, przeniesionych następnie do temp. 18° .
 Localisation des traces dans les cellules du méristème racinaire des plantes placées pendant 4 jours à 4° , incubées avec l'adénine- ^{14}C pendant 2 heures au cours du troisième jour, et transférées à 18° .

Liczba godzin w 18° Durée d'incubation à 18° /heures/	Liczba śladów - Nombre de traces			
	jąderko nucléole	jądro noyau	cytoplasma cytoplasme	razem total
0	137 = 19%	308 = 44%	258 = 37%	703 = 100%
1	165 = 18%	403 = 43%	366 = 39%	934 = 100%
3	92 = 9%	334 = 33%	592 = 58%	1018 = 100%
5	69 = 7%	285 = 31%	580 = 62%	934 = 100%

mórkach zapas niskocząsteczkowych związków adeniny, który uległ wyczerpaniu w 1 godz. przebywania roślin w temp. 18° . W tym czasie nastąpił wzrost radioaktywności preparatów o $1/5$, ale względny udział jądra, jąderka i cytoplazmy w całkowitej radioaktywności komórek nie został zmieniony w porównaniu z czasem 0. W dalszych próbkach — po 3 i 5 godz. — całkowita radioaktywność komórek pozostawała mniej więcej taka sama jak po 1 godz.; nastąpiło jednak wyraźne przesunięcie radioaktywności z jąderka i jądra do cytoplazmy (fig. 2). Względne rozmieszczenie radioaktywności zbliżyło się do takiego stanu, jaki obserwowano przy długotrwałym włączaniu adeniny w temp. 18° (por. tabela 1). Zmiana w intensywności znakowania poszczególnych stref komórek, w czasie od 1 do 5 godz., odbyła się bez wzrostu radioaktywności całkowitej, podobnie jak analogiczna zmiana w doświadczeniu poprzednim po 3 i 8 godz. (por. tabela 4). Zmianę tę można interpretować jako przejście z jądra do cytoplazmy związków zawierających adeninę. Wzrost ilości śladów w cytoplazmie wynosi w przybliżeniu tyle, ile strata ilości śladów w jądrze i w jąderku.

Włączanie fenyloalaniny- ^{14}C

Analogicznie do doświadczeń z adeniną- ^{14}C przeprowadzano doświadczenia nad wpływem chłodzenia na włączanie fenyloalaniny- ^{14}C . Ilość znakowanej fenyloalaniny włączanej do korzeni wyraźnie spada w miarę przedłużania poprzedzającego inkubację okresu chłodzenia (ta-

T a b e l a 6 - T a b l e a u 6

Wpływ chłodzenia na włączanie fenyloalaniny- ^{14}C do komórek
merystemu korzeniowego Vicia faba.

Influence de la basse température sur l'incorporation de phénylalanine
- ^{14}C dans les cellules du méristème racinaire de Vicia faba.

Liczba dni w 4° Durée de prétraitement à 4° /jours/	Liczba śladów - Nombre de traces			
	jąderko nucleole	jądro noyau	cytoplasma cytoplasme	razem total
0 /Kontrola-Témoin/	92 = 4%	618 = 31%	1302 = 65%	2012 = 100%
1	62 = 10%	228 = 36%	348 = 54%	638 = 100%
2	42 = 10%	156 = 39%	206 = 51%	404 = 100%
3	33 = 13%	91 = 37%	124 = 50%	248 = 100%
4	17 = 13%	60 = 44%	58 = 43%	135 = 100%

T a b e l a 7 - T a b l e a u 7

Zlokalizowanie śladów ^{14}C fenyloalaniny w merystemie korzeniowym
roślin chłodzonych przez 3 dni w 4° , następnie inkubowanych 24 godz.
z fenyloalaniną- ^{14}C w 4° , po czym przeniesionych do fenyloalaniny
 ^{12}C do temp. 18° .

Localisation des traces dans les cellules du méristème racinaire des
plantes prétraitées 3 jours à 4° , ensuite incubées pendant 24 heures avec
la phénylalanine- ^{14}C et transférées à 18° au milieu contenant de la
phénylalanine- ^{12}C .

Czas trwania inkubacji z fenyloalaniną- ^{12}C w 18° Durée d'incubation avec phénylalanine- ^{12}C à 18°	Liczba śladów - Nombre de traces			
	jąderko nucleole	jądro noyau	cytoplasma cytoplasme	razem total
1 godz. 1 heure	49 = 8%	229 = 35%	366 = 57%	644 = 100%
3 godz. 3 heures	60 = 9%	247 = 36%	378 = 55%	685 = 100%
8 godz. 8 heures	63 = 9%	245 = 35%	398 = 56%	706 = 100%
24 godz. 24 heures	41 = 8%	204 = 38%	286 = 54%	531 = 100%

bela 6). Na autoradiogramach liczono liczbę śladów w jąderku, jądrze i cytoplazmie. Radioaktywność całkowita po 4 dniach chłodzenia spadła około 15 razy; włączanie fenyloalaniny jest więc silniej hamowane przez obniżoną temperaturę niż włączanie adeniny. Rozpatrywane części komórki reagują niejednakowo, a mianowicie jąderko przyłącza 5 razy mniej fenyloalaniny, jądro — 10 razy mniej, a cytoplazma — 22 razy mniej. W czasie chłodzenia redukcja włączania fenyloalaniny odbywa się mniej więcej równomiernie w każdym organoidzie. Uderzający jest brak zbieżności pomiędzy zachowaniem się RNA i białek jądra, ocenianym na podstawie włączania adeniny- ^{14}C i fenyloalaniny- ^{14}C podczas pierwszych 2 dni doświadczenia. Zamiast z reguły stwierdzanej równoległości pomiędzy syntezą RNA i białek, w tym przypadku po 2 dniach chłodzenia, liczba śladów ^{14}C adeniny w jądrze wykazała tendencję zwykłą, podczas gdy liczba śladów ^{14}C fenyloalaniny spadała do 1/4 w jądrze i 1/2 w jąderku (por. wykres 1). W obu doświadczeniach znakowanie cytoplazmy zmniejszało się gwałtownie, przy czym redukcja znakowania fenyloalaniną była nieznacznie większa niż znakowania adeniną.

W przeciwieństwie do adeniny, rozmieszczenie śladów fenyloalaniny nie ulegało zmianie po przeniesieniu materiału chłodzonego do temp. 18° (tabela 7, por. z adeniną, tabela 4).

Włączanie tymidyny- ^3H

Autoradiogramy z roślin inkubowanych z adeniną- ^{14}C wykonywano w dwóch seriach. W pierwszej obliczano całe włączanie adeniny, w drugiej, trawionej rybonukleazą, pozostała radioaktywność reprezentowała ilość adeniny włączonej do DNA. Jak już wspomniano, ilość włączonej adeniny spada po 4 dniach chłodzenia. Po 1 dniu chłodzenia, ilość adeniny włączonej do DNA pozostaje na poziomie kontroli; gwałtowny spadek obserwuje się po 2 i następnych dniach. Po 4 dniach chłodzenia włączanie adeniny do DNA jest minimalne. Porównując włączanie adeniny do DNA i RNA jądra stwierdza się, że zahamowanie włączania do DNA rozpoczyna się wcześniej, tj. w 2 dniu chłodzenia, podczas gdy włączanie do RNA jądra trwa dłużej — ostre zahamowanie uwydatnia się po 3 dniach chłodzenia.

Rozpatrywano włączanie tymidyny- ^3H w takim samym układzie doświadczeń jak w przypadku adeniny. Nie udało się ustalić dokładnych danych liczbowych w kolejnych dniach chłodzenia, ponieważ w preparatach kontrolnych i po 1 dniu chłodzenia znakowanie jąder jest tak silne, że ziarna w emulsji zlewają się w jedną czarną masę. Ogólna tendencja redukcji włączania tymidyny była jednak bardzo zbliżona do obniżania włączania adeniny do DNA. Po 1 dniu chłodzenia ponad 70% jąder było bardzo silnie znakowanych, po 2 dniach — jesz-

cze około 60%, ale liczba ziaren w jądrze wynosiła ok. 20 i były już one rozróżnialne (fig. 3); po 3 dniu chłodzenia liczba ziaren w 27% jąder jest jeszcze uchwytana, ale wynosi zaledwie około 5 (fig. 4); po 4 dniach chłodzenia zarówno ilość znakowanych jąder, jak i ilość ziaren w jądrze jest bliska 0.

Na cienkich skrawkach jest tylko część jądra, nie można więc wykazać całej jego radioaktywności. Natomiast na preparatach gniecionych jądro i jąderko zostają silnie spłaszczone i dzięki temu może być wyjawiona duża ilość zawartego w jądrze prekursora radioaktywnego. W rezultacie jądra, które w skrawkach zawierały ok. 20 ziaren, na preparatach gniecionych wykazywały ich ok. 60; odpowiednio w jądrach z 5 ziarnami znajdowało się ok. 20 ziaren (fig. 5 i 6).

W autoradiogramach rozmieszczenie związku znakowanego może być określane z dokładnością od 0,5 do 2 μ — zależnie od użytej emulsji. Ścisłość lokalizacji wynika z bardzo małej energii promieniowania ^3H . Dzięki temu można ocenić morfologię struktur (składników) komórkowych przyłączających prekursor znakowany ^3H na podstawie układu ziaren w emulsji (Rodkiewicz i Olszewska 1962). Po dłuższym chłodzeniu chromatyna została oznakowana w niektórych miejscach przez grupy ziarenek, a przy skracaniu czasu chłodzenia (a więc przy intensywniejszej syntezie DNA) na terenie jądra obok grup ziarenek znajdują się ziarenka uszeregowane w łańcuszki sygnalizujące ułożenie nici chromatynowych. W warunkach obniżonej temperatury dobitnie zostaje więc wyrażona asynchroniczność syntezy DNA wzdłuż nici chromatynowej.

Podczas chłodzenia zmniejsza się znacznie aktywność mitotyczna (Rodkiewicz 1961). Po 1 i 2 dniach chłodzenia spotyka się obok mitoz nie znakowanych także mitozy z chromosomami radioaktywnymi. Po 3 dniach chłodzenia ilość mitoz jest bardzo mała. Po przeniesieniu do temp. 18° roślin chłodzonych przez 4 dni, w krótkim czasie rozpoczyna się włączanie tymidyny- ^3H . Mitozy zaobserwowano w 10 i 20 godz. po przeniesieniu do temp. 18°. Jeśli roślinom w czasie chłodzenia podawano tymidynę- ^3H w 1 lub 2 dniu, to chromosomy mitotyczne były częściowo lub całkowicie znakowane, bądź zupełnie nie znakowane.

DYSKUSJA

Z uzyskanych rezultatów wyłaniają się dwa zagadnienia, które zasługują na bliższe omówienie, a mianowicie: 1) problem pochodzenia RNA cytoplazmatycznego, 2) paralelizm pomiędzy zachowaniem się RNA i białek w jądrze i w cytoplazmie.

Wyniki badań autoradiograficznych przyczyniły się do ugruntowania poglądu o istnieniu tzw. messenger RNA, tj. RNA informacyjnego. Sekwencja nukleotydów w informacyjnym RNA jest determinowana

przez odpowiedni DNA. Informacyjny RNA przechodzi do cytoplazmy i tam stanowi wzorec dla syntezy łańcuchów polipeptydowych. Schemat eksperymentów autoradiograficznych, służących do wykazania wędrówki RNA, przedstawia się jak następuje: materiał jest krótko inkubowany z radioaktywnym prekursorem RNA i następnie zostaje przeniesiony do środowiska z nieradioaktywnym prekursorem (w celu rozcieńczenia zapasu wolnego radioaktywnego prekursora zawartego jeszcze w komórkach). Prawie zawsze obserwowano na początku wyłączenie lub silniejsze znakowanie jądrowego RNA. Po przeniesieniu do środowiska nieradioaktywnego, radioaktywny RNA pojawia się w cytoplazmie. Zjawisko to służy za dowód przechodzenia RNA z jądra do cytoplazmy (Goldstein i Micoiu 1959a i b; Sirlin i Elsdale 1959; Amano i Leblond 1960; Feinendegen i in. 1960; Perry 1960; Sirlin 1960; Taylor 1960; Perry i in. 1961; Olszewska i in. 1961). U roślin wyższych tego rodzaju badania zostały wykonane jedynie przez Woodsa (1959) na merystemie korzeniowym bobu. Jednoznaczną interpretację wyników utrudnia fakt, że pomimo przeniesienia materiału do środowiska nieradioaktywnego, radioaktywność komórek przez pewien czas bardzo silnie się zwiększa kosztem wewnątrzkomórkowego zapasu niskocząsteczkowych radioaktywnych związków. Np. we wspomnianej pracy Woodsa ogólna radioaktywność komórek wzrosła jeszcze czterokrotnie po dwugodzinnej inkubacji w środowisku nieradioaktywnym.

Względne zmiany ilości prekursora przy zwiększaniu się ogólnej radioaktywności preparatu nie są rozstrzygającym dowodem o przechodzeniu prekursora z jądra do cytoplazmy. Jeśli całkowita radioaktywność preparatu ulega zmianie in plus lub in minus, to zmiany względne pomiędzy radioaktywnością cytoplazmy i jądra mogą być tłumaczone nie tylko przenoszeniem prekursora z jednej strefy komórki do drugiej, ale również nieproporcjonalnym zwiększeniem się syntezy lub rozpadu związków zawierających ten prekursor. Bardziej wiarygodne byłoby doświadczenie, w którym w oznakowanym materiale przy braku dopływu prekursora z zewnątrz i bez zmiany poziomu radioaktywności całkowitej preparatu następowałoby przesunięcie materiału radioaktywnego. Taka sytuacja miała miejsce w doświadczeniu, w którym adeninę- ^{14}C podano w ciągu 2 godz. w trakcie 3 dni chłodzenia, po czym materiał chłodzono przez dalsze 22 godz. W tych warunkach znaczna część zapasu niskocząsteczkowych radioaktywnych związków adeniny uległa włączeniu do kwasów nukleinowych komórki, ponieważ po przeniesieniu do temp. 18° radioaktywność całkowita wzrosła jedynie w ciągu 1 godz. o $1/5$. W następnych godzinach, przy stałym poziomie radioaktywności całkowitej, ilość radioaktywnego cytoplazmatycznego RNA zwiększa się kosztem RNA jądrowego. Zmiany te można interpretować jako przechodzenie RNA z jądra do cytoplazmy.

Pozostaje jednak nie rozstrzygnięty, odrębny problem, w jakiej formie radioaktywny materiał zostaje przekazany z jądra do cytoplazmy. Po-
wszechnie postulowany messenger RNA powinien przechodzić w formie
integralnej cząsteczki. RNA jądrowy charakteryzuje się wysoką aktyw-
nością metaboliczną (ref. Olszewska 1962). Jest możliwe, że przy
normalnym metabolizmie (w temp. 18°), radioaktywny RNA jądra ulega
rozkładowi, którego produkty przechodzą do cytoplazmy i tam służą

Wykres 1. Wpływ chłodzenia na włączanie adeniny- ^{14}C i fenyloalaniny- ^{14}C do komórek merystemu korzeniowego *Vicia faba*. Rzędna — zmiany radioaktywności w porównaniu z materiałem kontrolnym, dla którego ilość śladów przyjęto za 100; odcięta — ilość dni w temp. 4°.

1 — włączanie adeniny do jądra i jąderka; 2 — włączanie adeniny do cytoplazmy; 3 — włączanie fenyloalaniny do jądra i jąderka; 4 — włączanie fenyloalaniny do cytoplazmy.

Influence de la basse température sur l'incorporation d'adénine- ^{14}C et de phénylalanine- ^{14}C dans les cellules du méristème racinaire de *Vicia faba*. Ordonnée — le changement de la radioactivité; le nombre de traces dans le matériel témoin est considéré comme 100; abscisse — la durée du traitement à 4°.

1 — l'incorporation d'adénine- ^{14}C dans le nucléole et dans le noyau; 2 — l'incorporation d'adénine dans le cytoplasme; 3 — l'incorporation de phénylalanine dans le nucléole et dans le noyau; 4 — l'incorporation de phénylalanine dans le cytoplasme.

do budowy cząsteczek syntetyzowanego od nowa RNA; stąd wzrost ilości śladów w cytoplazmie wynosi tyle, ile ubytek ilości śladów w jądrze. Tak właśnie interpretują wyniki badań autoradiograficznych McMaster i Taylor (1958, 1959), McMaster-Kaye (1960) oraz Harris i Watts (1962).

W normalnej komórce prekursorzy białek i RNA intensywnie włączają się do jądra i cytoplazmy. Jak wielokrotnie stwierdzono, synteza białek jest uwarunkowana uprzednią syntezą RNA (ref. Brachet 1957). W omawianym materiale, po 1 i 2 dniach chłodzenia, włączanie adeniny do jądra utrzymuje się jeszcze na wysokim poziomie, podczas gdy włączanie fenyloalaniny spada gwałtownie. Nasuwa się pytanie, gdzie należy szukać przyczyn rozprężenia tych procesów. Wysoki poziom radioaktywnej adeniny w jądrze, sugerujący normalny przebieg syntezy RNA, wynika — jak się zdaje — przede wszystkim z zahamo-

wania transportu RNA z jądra do cytoplazmy. W konsekwencji przekaznikowy (messenger) RNA skupia się w jądrze. Tak więc normalny poziom radioaktywnej adeniny zostaje zachowany, pomimo spadku jej włączania do jądrowego i przekaznikowego RNA. Duża ilość obecnego w jądrze przekaznikowego RNA nie może — jak widać — brać udziału w syntezie białek jądrowych, a ilość RNA związanego z ich syntezą okazuje się niewystarczająca, chociaż synteza białek jądrowych jest w mniejszym stopniu dotknięta niż synteza białek cytoplazmatycznych. Skoro tak jest, to zrozumiałe staje się zmniejszanie ilości włączonej do jądra fenyloalaniny. Nie można jednak wykluczyć w opisanych doświadczeniach innych czynników, warunkujących syntezę białek jądrowych.

STRESZCZENIE

Metodą autoradiografii porównywano ilościowo włączanie tymidyny- ^3H do DNA (kwasu dezoksyrybonukleinowego), adeniny-8- ^{14}C do DNA i RNA (kwasu rybonukleinowego) oraz fenyloalaniny-2- ^{14}C do białek komórek merystemu korzeniowego *Vicia faba*. Rośliny przed podaniem prekursorów utrzymywano przez 1 do 4 dni w temp. 4°C . Włączanie prekursorów do białek i RNA cytoplazmy zostaje stopniowo zahamowane i po 4 dniach chłodzenia adenina jest przyłączana 15-krotnie słabiej, a fenyloalanina — 22-krotnie. W tym samym czasie również ulega zahamowaniu przyłączanie prekursorów do jądra — tymidyny i adeniny do DNA prawie całkowicie, adeniny do RNA — ok. 3-krotnie, a fenyloalaniny — 10-krotnie. Po 1 i 2 dniu w obniżonej temperaturze, ilość radioaktywnej adeniny w jądrowym RNA ulega nawet zwiększeniu, podczas gdy włączanie innych prekursorów wyraźnie spada. Zwiększenie ilości adeniny radioaktywnej należy tłumaczyć zahamowaniem odpływu informacyjnego (messenger) RNA z jądra do cytoplazmy. W rezultacie zaburzeń w transporcie zwiększa się udział jądra w całkowitej radioaktywności komórki. Po przeniesieniu roślin do temp. 18° do środowiska bez prekursora, w ciągu 1 godz. zużywa się zapas wolnej adeniny- ^{14}C i ustala się określony poziom radioaktywności całkowitej. Po dalszych 4 godz. nadmiar przyłączonej do jądra adeniny- ^{14}C przechodzi do cytoplazmy — czego wyrazem jest zwiększenie radioaktywności cytoplazmy przy odpowiednim zmniejszeniu radioaktywności jądra.

Za odczynniki niezbędne do autoradiografii serdecznie dziękujemy prof. dr. J. Brachet i prof. dr. M. Errerze z Université Libre w Brukseli.

Katedra Anatomii i Cytologii Roślin
Uniwersytetu Łódzkiego

(Wpłynęło dn. 7.11.1962)

RESUMÉ

Nous avons comparé, par autoradiographie, l'incorporation de la thymidine- ^3H dans l'ADN, de l'adénine-8- ^{14}C dans l'ARN et l'ADN (digestion à la ribonucléase) et de la phénylalanine-2- ^{14}C dans les protéines des cellules du méristème racinaire de *Vicia faba*.

Les plantes ont été soumises à l'action de la basse température (4°C) pendant 1, 2, 3 et 4 jours et ensuite incubées avec les précurseurs radioactifs, à la même température, durant 24 h. Les racines ont été fixées dans un mélange alcool absolu — acide acétique glacial (3:1); les coupes à la paraffine ou les frottis ont été recouverts d'émulsion Ilford G 5 d'après Ficq (1955).

Dans le cytoplasme, l'incorporation des précurseurs dans les protéines et l'ARN diminue à mesure qu'on prolonge le prétraitement à 4°; après 4 jours à cette température, l'incorporation de l'adénine est réduite 15 fois (tab. 1), celle de la phénylalanine — 22 fois (tab. 6). L'incorporation des précurseurs dans les noyaux du même matériel est aussi inhibée: l'incorporation de la thymidine et de l'adénine dans l'ADN est presque nulle (tab. 2, fig. 3 et 4), l'incorporation de la phénylalanine diminue 10 fois, celle de l'adénine dans l'ARN nucléaire n'est réduite que 3 fois.

Dans les noyaux après 1 et 2 jours à 4°, l'incorporation de la thymidine et de la phénylalanine diminue considérablement, tandis que l'incorporation de l'adénine augmente. Il en résulte un rapport de la radioactivité du noyau et du cytoplasme qui est caractéristique de celui du matériel témoin n'incubé que 15 min. avec l'adénine-¹⁴C (tab. 3). L'incorporation accrue de l'adénine dans l'ARN du noyau indique que le transfert de „messenger RNA” est inhibé; la part relative du noyau dans la radioactivité totale augmente.

Les plantes prétraitées 3 jours à 4° ont été incubées pendant 2 h. avec l'adénine-¹⁴C à la même température, ensuite placées au milieu non radioactif, à 4°. Au bout du 4 jour à 4°, le matériel a été transféré à 18°. Au cours de la première heure à 18°, la réserve d'adénine-¹⁴C est épuisée et la radioactivité totale demeure pendant plusieurs heures au niveau constant, bien que la répartition du matériel radioactif change: on observe le démarquage des noyaux, accompagné de l'augmentation de la radioactivité du cytoplasme (tab. 5).

En conclusion, l'incorporation cytoplasmique des précurseurs de l'ARN et des protéines à 4° est plus atteinte que l'incorporation nucléaire; il est bien possible que cette altération soit due à l'inhibition du transfert de l'ARN du noyau au cytoplasme.

LITERATURA

- Amano M., Leblond C. P., 1960, Comparison of the specific activity curves of ribonucleic acid in chromatine, nucleolus and cytoplasm, *Exptl. Cell. Res.* 20: 250—253.
- Brachet J., 1957, *Biochemical cytology*, Academic Press, New York, London.
- Feinendegen L. E., Bond V. P., Shreeve W. W., Painter R. B., 1960, RNA and DNA metabolism in human tissue culture studied with tritiated cytidine, *Exptl. Cell Res.* 19: 443—459.
- Ficq A., 1955, Etude autoradiographique du métabolisme de l'oocyte d'*Asteria rubens* au cours de la croissance, *Arch. Biol.* 66: 286—509—525.
- Ficq A., 1959, *Autoradiography*. In: *The Cell*, vol. I, Academic Press, New York, London.
- Goldstein L., Micou J., 1959a, Nuclear-cytoplasmic relationship in human cells in tissue culture. III. Autoradiographic study of interrelation of nuclear and cytoplasmic ribonucleic acid, *J. Bioph. Bioch. Cytology* 6: 1—6.
- Goldstein L., Micou J., 1959b, On the primary site of nuclear RNA synthesis, *J. Bioph. Bioch. Cytology* 6: 301—304.

- Harris H., Watts J. W., 1962, The relationship between nuclear and cytoplasmic ribonucleic acid, *Proc. Roy. Soc. B.*, 156: 109—121.
- La Cour L. F., 1952, The physiology of chromosome breakage and reunion in *Hyacinthus*, *Heredity* 6: suppl. 163.
- McMaster-Kaye R., 1960, The metabolic characteristics of nucleolar, chromosomal and cytoplasmic ribonucleic acid of *Drosophila* glands, *J. Bioph. Bioch. Cytology* 8: 365—378.
- McMaster-Kaye R., Taylor H., 1958, Evidence for two metabolically distinct types of ribonucleic acid in 'chromatin and nucleoli, *J. Bioph. Bioch. Cytology* 4: 5—11.
- McMaster-Kaye R., Taylor H., 1959, The metabolism of chromosomal ribonucleic acid in *Drosophila* salivary glands and its relation to synthesis of deoxyribonucleic acid, *J. Bioph. Bioch. Cytology* 5: 461—467.
- Olszewska M. J., 1962, Rola biologiczna kwasów rybonukleinowych, *Wiad. Bot.* 6: 109—130.
- Olszewska M. P., de Vitry F., Brachet J., 1961, Influence de l'irradiation UV sur l'incorporation de l'adénine-8-¹⁴C et de la DL-méthionine-³⁵S dans l'algue *Acetabularia mediterranea*, *Exptl. Cell Res.* 24: 58—63.
- Perry R. P., 1960, On the nucleolar and nuclear dependence of cytoplasmic RNA synthesis in HeLa cells, *Exptl. Cell Res.* 20: 216—220.
- Perry R. P., Hell A., Errera M., 1961, The role of the nucleolus in ribonucleic acid and protein synthesis. I. Incorporation of the cytidine into normal and nucleolar inactivated HeLa cells, *Bioch. Bioph. Acta* 49: 47—57.
- Rodkiewicz B., 1961, Zagadnienie stałości poziomu KDN mierzonego fotometrycznie po reakcji Feulgena w różnych komórkach roślinnych, *Zeszyty Nauk. Uniwersytetu Łódzkiego, Seria II*, 10: 83—117.
- Rodkiewicz B., Olszewska M. J., 1962, Incorporation de la thymidine-³H dans les noyaux à différente structure en interphase, *Exptl. Cell Res.* 27: 186—188.
- Sirlin J. L., Elsdale T. R., 1959, Rates of labelling of RNA and proteins in cell components of the amphibian myoblast, *Exptl. Cell Res.* 18: 268—281.
- Woods P. S., 1959, RNA in nuclear-cytoplasmic interaction, *Brookhaven Symposia Biol.* 12: 153—174.

Tablica I

Fig. 1. Merystem korzeniowy roślin chłodzonych przez 4 dni, inkubowanych przez 2 godz. z adeniną-8- ^{14}C w ciągu trzeciego dnia chłodzenia. Ślady są zlokalizowane głównie w jądrze i w jąderku

Méristème racinaire des plantes placées pendant 4 jours à 4°, incubées avec l'adénine-8- ^{14}C au cours du troisième jour pendant 2 heures. Le nucléole et le noyaux sont beaucoup plus marqués que le cytoplasme

Fig. 2. Merystem korzeniowy roślin potraktowanych jw., utrwalony w 5 godzin po przeniesieniu do temp. 18°. Ślady zlokalizowane są głównie w cytoplazmie

Méristème racinaire des plantes traitées comme précédemment, ensuite transférées durant 5 h. à 18°. Le cytoplasme est plus marqué que le nucléole et le noyau

Fig. 3. Skrawek z merystemu korzeniowego roślin chłodzonych przez 24 godz., inkubowanych następnie przez 24 godz. w 4° z tymidyną- ^3H . Większość jąder znakowanych, w przybliżeniu 20 ziaren w każdym jądrze

Coupe du méristème racinaire d'une plante prétraitée à 4° pendant 24 heures, ensuite incubée à 4° durant 24 heures avec la thymidine- ^3H . De nombreux noyaux sont marqués, on rencontre env. 20 grains par noyau

Fig. 4. Skrawek z merystemu korzeniowego rośliny chłodzonej przez 48 godz., inkubowanej następnie przez 24 godz. w temp. 4°C z tymidyną- ^3H . W jądrach radioaktywnych znajduje się po ok. 5 ziaren

Coupe du méristème racinaire d'une plante prétraitée à 4° pendant 48 heures, ensuite incubée à 4° durant 24 heures avec la thymidine- ^3H . Dans les noyaux marqués on ne rencontre qu'env. 5 grains

Fig. 5 i 6. Rozpłaszczone komórki z merystemu korzeniowego roślin chłodzonych przez 24 godz. (fig. 5) i 48 godz. (fig. 6), następnie inkubowanych przez 24 godz. w temp. 4° z tymidyną- ^3H . Stwierdza się większą ilość ziaren niż w jądrach ze skrawków (fig. 3 i 4)

Frottis des méristèmes radiculaires des plantes prétraitées à 4° pendant 24 heures (fig. 5) et 48 heures (fig. 6), ensuite incubées à 4° durant 24 heures avec la thymidine- ^3H . Les noyaux sont plus marqués que ceux dans les coupes présentés ci-dessus