

PL ISSN 0324 - 833X

**POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE**

Postępy Biologii Komórki

TOM 12 - NR 2

1985 (121-162)

BWN - WARSZAWA

<http://rcin.org.pl>

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego
wydawany z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Redaguje Kolegium

Jerzy KAWIAK,
Wincenty KILARSKI, Jan MICHEJDA, Maria OLSZEWSKA,
Maciej KAWALEC

Rada Redakcyjna

Jadwiga ACKERMAN, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Aleksander KOJ,
Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI, Zofia OSUCHOWSKA — przewod-
nicząca, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Stanisław ZAWISTOWSKI

Adres Redakcji

Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego,
ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa

Państwowe Wydawnictwo Naukowe — Oddział we Wrocławiu

Nakład 542 + 98 egz. Ark. wyd. 3. Ark. druk. 25 $\frac{1}{8}$. Papier druk. sat. kl. III, 80 g, 70 × 100 cm.
Oddano do składania 11 II 1985 r. Podpisano do druku w sierpniu 1985 r. Druk ukończono
w sierpniu 1985 r. Zam. 3093/85. Cena zł 100.—

Wrocławska Drukarnia Naukowa, Wrocław, ul. Lelewela 4

PROFESOR JAN ADAM ZURZYCKI

27 lipca 1984 zmarł w Krakowie profesor zwyczajny Uniwersytetu Jagiellońskiego, członek rzeczywisty Polskiej Akademii Nauk, członek zagraniczny Niemieckiej Akademii Nauk Przyrodniczych „Leopoldina”, uczony o światowej sławie, Jan Zurzycki. Jego niespodziewana, przedwczesna śmierć w wyniku rozległego zawału serca pograżyła w głębokim żalu społeczność naukową w Polsce. Uniwersytet Jagielloński, z którym profesor Zurzycki był związany od 1945 r. poniósł niepowetowaną stratę.

Profesor Zurzycki całe swe życie poświęcił nauce, badaniom naukowym, nauczaniu i kształceniu młodych kadr naukowych, a także organizowaniu życia naukowego w skali krajowej i międzynarodowej. Urodził się w Krakowie 10 lutego 1925 i tutaj zastał Go wybuch II wojny światowej. Zmuszony przerwać naukę w IV Gimnazjum i Liceum Ogólnokształcącym, uczył się nadal w Liceum Budowy Maszyn, a od marca 1943 r. rozpoczął pracę w Krakowskiej Fabryce Maszyn „Zieleniewski i Fitzner-Gamper”. Po wyzwoleniu Krakowa w 1945 r. rozpoczął studia na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym Uniwersytetu Jagiellońskiego, które ukończył już w 1948 r., uzyskując dyplom magistra filozofii z zakresu przyrody.

Pracę dydaktyczną rozpoczął w kwietniu 1947 r., będąc jeszcze studentem, a w roku 1948 objął stanowisko asystenta w Katedrze Fizjologii Roślin U. J., kierowanej przez prof. Franciszka Górskiego. Stopień doktora nauk przyrodniczych uzyskał w 1950 r., mając 25 lat. W 1956 r. został powołany na stanowisko docenta, a w 1963 r., gdy miał zaledwie 38 lat, Rada Państwa nadała Mu tytuł profesora nadzwyczajnego.

W roku 1967, po przejściu na emeryturę prof. Górskiego, objął kierownictwo Katedry Fizjologii Roślin, przekształconej w 1970 r. w Zakład

Fizjologii Roślin IBM UJ, którym kierował do ostatnich dni swego życia. W roku 1969 prof. Zurzycki został powołany na członka korespondenta Polskiej Akademii Nauk; w 1971 r. otrzymał tytuł naukowy profesora zwyczajnego; w 1977 r. był wybrany na członka zagranicznego Niemieckiej Akademii Nauk Przyrodniczych „Leopoldina”, a w 1980 r. na członka rzeczywistego Polskiej Akademii Nauk.



W latach 1954-1970 prof. Zurzycki wykładał w Wyższej Szkole Pedagogicznej w Krakowie, gdzie zorganizował Zakład Fizjologii Roślin, którym w tym okresie kierował.

W latach 1969-1971 był współorganizatorem Instytutu Biologii Molekularnej, a od 1972 r. był jego pierwszym dyrektorem.

Poza Instytutem prof. Zurzycki pełnił rozliczne funkcje w Uniwersytecie Jagiellońskim, m.in. jako prodziekan, prorektor, członek Senatu i wielu Komisji Senackich. Był przez wiele kadencji członkiem Centralnej Komisji Kwalifikacyjnej ds. Kadry Naukowej, Rady Głównej i Zespołu Dydaktyczno-Wychowawczego przy Ministerstwie Nauki, Szkolnictwa Wyższego i Techniki. Koordynował problemy węzłowe i między-

resortowe, związane z fizjologią roślin. Działał w licznych zagranicznych i krajowych Towarzystwach Naukowych, organizował wiele międzynarodowych i krajowych zjazdów i sympozjów naukowych. Był członkiem i przewodniczącym Rad Naukowych kilku instytutów naukowych, redaktorem bądź członkiem redakcji 6 międzynarodowych czasopism naukowych.

Prof. Zurzycki był odznaczony przez Radę Państwa Złotym Krzyżem Zasługi, Krzyżem Kawalerskim i Oficerskim Orderu Odrodzenia Polski, tytułem Zasłużonego Nauczyciela PRL, a także wielokrotnie nagradzany nagrodami ministra Nauki, Szkolnictwa Wyższego i Techniki oraz sekretarza naukowego Polskiej Akademii Nauk.

Nie sposób wymienić wszystkich zaszczytnych i odpowiedzialnych funkcji oraz wszystkich dokonań prof. Zurzyckiego. Światową sławę przyniosły prof. Zurzyckiemu studia nad zagadnieniami z zakresu fotobiologii. Jego zainteresowania naukowe koncentrowały się głównie na analizowaniu zależnego od światła zachowania się chloroplastów w komórkach roślinnych. Jego klasyczne już, ilościowe badania przemieszczania się chloroplastów, rozpoczęte na początku lat pięćdziesiątych, wzbudziły zainteresowanie tym problemem w licznych pracowniach zagranicznych, gdzie do dziś są intensywnie rozwijane. Opublikował ok. 70 prac doświadczalnych, kilkanaście artykułów przeglądowych. Był redaktorem i współautorem podręcznika „Fizjologia roślin”, wyróżnionego nagrodą I stopnia Ministra Nauki, Szkolnictwa Wyższego i Techniki oraz autorem i współautorem kilku opracowań monograficznych. Pod kierunkiem prof. Zurzyckiego 14 Jego uczniów obroniło prace doktorskie, 5 zaś uzyskało stopień doktora habilitowanego i 1 — tytuł profesora nadzwyczajnego.

Profesor Zurzycki był wybitnie i wszechstronnie uzdolnionym uczonym, dydaktykiem, wychowawcą młodej kadry naukowej i organizatorem życia naukowego. Przede wszystkim był jednak uczonym i nauczycielem z głębokiego powołania. Praca badawcza była Jego pasją. Źródłem Jego największych radości były nie zaszczyty i wysokie godności, ale eksperymenty naukowe, w których starał się rozszerzać wiedzę o żywych organizmach. Wszystkie Jego prace odznaczały się swoistym pięknem, jasnością logiczną i mistrzostwem w zaplanowaniu i przeprowadzeniu eksperymentu naukowego. Sam budował i konstruował prototypową aparaturę naukową. Prace prof. Zurzyckiego były nie tylko powszechnie znane i często cytowane w światowej literaturze naukowej i w zagranicznych podręcznikach, ale i budziły powszechny podziw.

Wspaniałe wykłady prof. Zurzyckiego, zawsze starannie przygotowane, niezależnie czy wygłaszane dla grona specjalistów, czy dla studentów lub uczniów szkół średnich, na zawsze pozostaną w pamięci tych, którzy mieli szczęście ich słuchać.

Prof. Zurzycki nigdy nie narzucał nikomu swego zdania, a uczył innych swoim przykładem i mądrą radą. Dla każdego, kto zwracał się do Niego o pomoc, znajdował czas, aby go wysłuchać i mu poradzić. Był nie tylko Mistrzem i Nauczycielem wielu pokoleń biologów, ale dla wielu z nich był serdecznym i oddanym przyjacielem. Mimo swej wielkości był człowiekiem niezwykle bezpośrednim, obdarzonym wielkim poczuciem humoru. Sylwetka prof. Jana Zurzyckiego — jako uczonego i człowieka całkowicie oddanego nauce i Uniwersytetowi Jagiellońskiemu — pozostanie wzorem dla tych, którzy mieli szczęście znać Go osobiście, a także dla przyszłych pokoleń badaczy przyrody.

Włodzimierz Korohoda

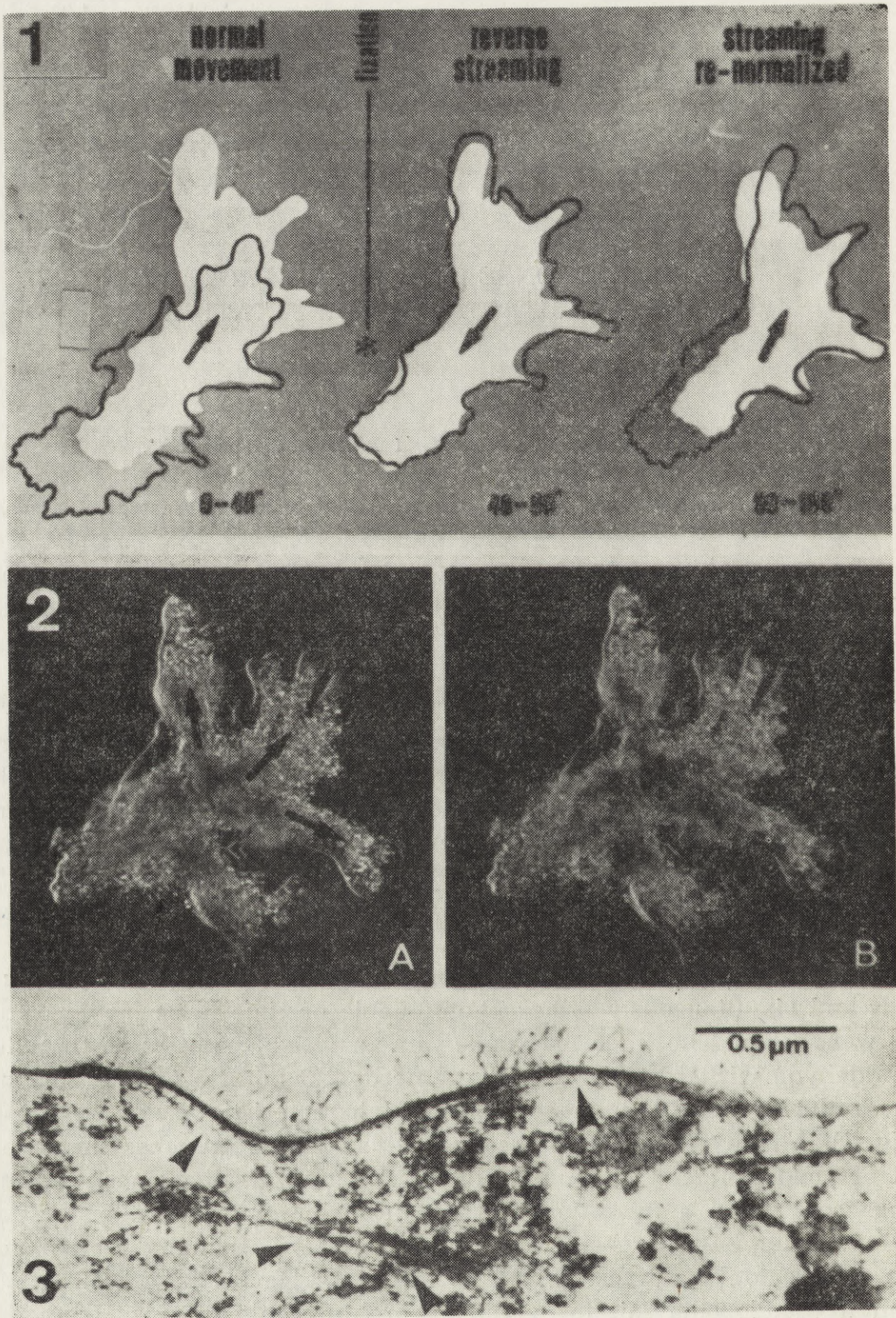
MOTOR RESPONSE OF *AMOEBA PROTEUS* TO THE GLUTARALDEHYDE FIXATIVE

L. GRĘBECKA, A. GRĘBECKI AND B. HREBENDA

Department of Cell Biology, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw

The great lability of the contractile layer of amoeba during normal locomotion and in response to contracting or relaxing stimuli makes an almost instantaneous fixation of the actomyosin system the necessary precondition of any ultrastructural research conceived as a means to study the mechanism of amoeboid movement. The 2% glutaraldehyde + 2% polyethylene glycol mixture is recently recommended [1] as providing more intense pictures of the contractile cortex in amoebae, than the fixatives containing osmium tetroxide. It became therefore necessary to test in what extent it satisfies the requirement of instantaneous fixation. Its action has been compared to that of 2.5% glutaraldehyde + 1% OsO_4 . Both solutions were prepared in 0.15 M PIPES or 0.1 M cacodylate buffer.

Fixation was run under continuous microscopic control of individual cells and simultaneously either photographic or time lapse movie pictures were taken. The frame-by-frame film analysis demonstrated that glutaraldehyde with polyethylene glycol needs 2-3 min. to operate and induces during that time a sequence of characteristic motor responses (Fig. 1). Already the first contact with this fixative provokes the reversal of endoplasmic streaming, a slight retraction of all formerly advancing fronts, and a dilatation of the tail region due to the endoplasm influx. After 30-50 s the streaming recovers its original direction and the tail region is further withdrawn. That stage lasts 1.5-2 min. But frontal pseudopodia fail to extend again (they only grow in diameter) and they are fixed in the retracted state, clearly different from the state they had during locomotion. Amoebae fixed in pure glutaraldehyde solutions behave exactly in the same manner.



It should be concluded therefore that this kind of fixation cannot reveal the concurrence of peripheral contraction and frontal relaxation in producing amoeboid movement, because everything is fixed in the contracting state. So, the better visualization of motile apparatus in that fixating solution seems to be largely a physiological artifact created by the motor response of amoeba to the fixative which acts as a potent contracting agent. Impossibility of fixing any advancing front in its original state excludes the study of normal locomotion or any reaction to behavioural stimuli.

When 1% OsO₄ is added to the glutaraldehyde solution, the fixation takes less than 1 s, and the cell has no time to produce any new motor response. Its size, shape and position, and in particular the macrostructure of its both poles of locomotion, remain unaltered (Fig. 2). The texture of its contractile layer is certainly more faint, however sufficiently preserved (Fig. 3). It seems that a slackening of the F-actin network by osmium represents a less serious danger for interpretation, than dealing with such a state of the motile apparatus which is not due to the cell response to that experimental situation which had to be investigated, but to its response to the fixating medium.

LITERATURE

- [1] STOCKEM W., HOFFMANN H. U., GAWLITTA W., Spatial organization and fine structure of the cortical filament layer in normal locomoting *Amoeba proteus*, *Cell Tiss. Res.*, **221**: 505-519, 1982.

Fig. 1. Cinematographic analysis of the size, shape and position changes of an amoeba before fixation, during the glutaraldehyde-induced reversal of the endoplasmic flow, and from the moment of streaming re-normalization up to the end of fixation. At each stage the black contour represents the initial and the white profile the final cell outline

Fig. 2. Amoeba about 1 s before fixation (A), and in fixed state 2-3 s later (B), after treatment with the glutaraldehyde + OsO₄ mixture

Fig. 3. Filaments (arrowheads) in the cortical cell layer of lateral body wall of amoeba after fixation in 2.5 glutaraldehyde + 1% OsO₄ + 0.1% acrolein

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.

PRZEMIESZCZANIE SIĘ PLASTYDÓW I MITOCHONDRIÓW
W MEJOTYCZNYCH KOMÓRKACH ROŚLIN WYŻSZYCH

THE CHANGING ARRANGEMENT OF PLASTIDS AND MITOCHONDRIA IN
MEIOTIC CELLS OF HIGHER PLANTS

Bohdan RODKIEWICZ, Józef BEDNARA i Irena GIEŁWANOWSKA *

Instytut Biologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Instytut Biologii, Wyższa Szkoła Pedagogiczna *

Streszczenie. Plastydy i mitochondria niektórych roślin przemieszczają się prawidłowo podczas mejozy. We wczesnej, pierwszej profazie mejotycznej wszystkie te organoidy gromadzą się na krótko w jedną grupę położoną przy jądrze komórkowym. Po pierwszej telofazie mejotycznej w sporogenezie, która kończy się cytokinezą jednoczesną, plastydy i mitochondria zbierają się w płaszczyźnie równikowej mejocytu. Po drugim podziale mejotycznym warstwy organoidów rozgraniczają komórkę na cztery części. Wewnątrz warstw organoidów zakładają się przegrody pierwotne.

Summary. Plastids and mitochondria of premeiotic cells are situated at random. Their position in some species changes during meiosis in an orderly manner. At the early prophase I all plastids and mitochondria gather for a short period in one group close to the nuclear envelope (Tab. 1a). Such groups were noticed in microsporogenesis in *Tradescantia* and *Impatiens* [22], *Lilium* [13] and *Pinus* [24], during sporogenesis in *Equisetum* [5] and megasporogenesis in some orchids [4, 23]. The group disperses long before the prophase I is concluded. There is no explanation for organelle aggregation and it is not known whether the phenomenon is widespread.

In plants of various taxa where meiosis is followed by simultaneous cytokinesis and formation of tetrahedral tetrads plastids and mitochondria (or only mitochondria in mosses) aggregate at the telophase I in the equatorial layer which divides the meiocyte into two mononucleate parts (Tab. 1 d, f, Tab. 2a). The layer exists until the telophase II; then in *Equisetum* and *Impatiens* it changes its shape and spreads between the posttelophase II nuclei.

The organelle layer in *Equisetum* differentiates into three strata. The middle one, mostly mitochondrial, is sandwiched by plastids (Tab. 2b). Finally, the cell plates set up in the mitochondrial strata and simultaneously divide the meiocyte into four spores (Fig. 5).

We assume that the organelle layer which aggregates after meiosis I in place of the cell plate, may play a role of a barrier: it prevents the coalescence of two kinetic spindles developing in common cytoplasm of binucleate meiocyte at meiosis II.

CYTOKINEZA I ROZDZIAŁ POPULACJI ORGANOIDÓW

Populacja plastydów i mitochondriów w komórce podczas symetrycznej mitozy albo mejozy jest rozdzielana mniej więcej równomiernie między potomne komórki. Prawdopodobnie rozdział ten nie jest zbyt ścisły, ale niekiedy bywa bardzo dokładny, jak np. w opisaney przez Brown i Lemmon [7] sporogenezie pewnych mchów. Późnoprofazowe mejocyty w sporangiach tych mchów mają po cztery plastydy, z których każdy znajdzie się w innej z czterech komórek pomejotycznych.

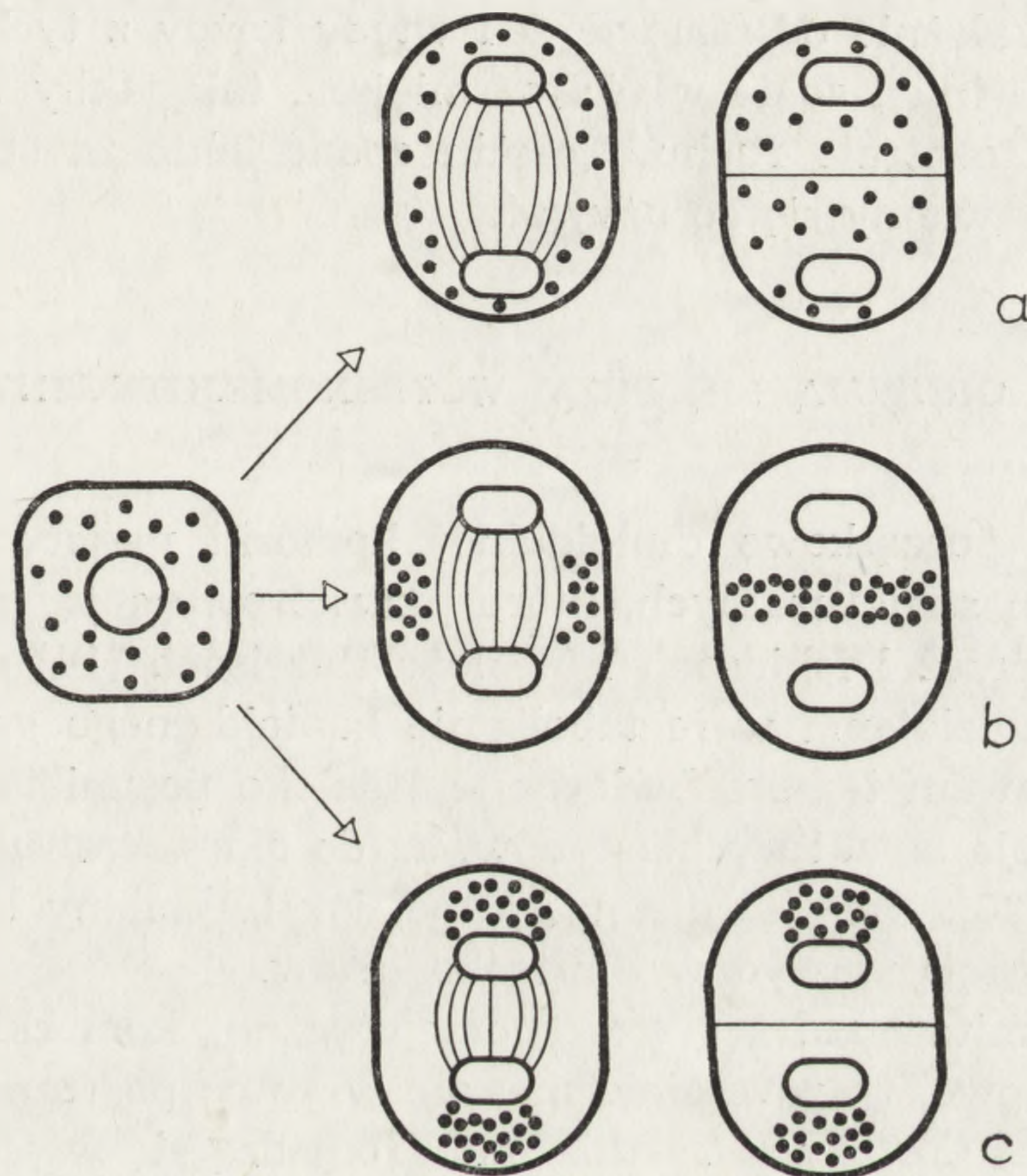
Kiedy mitozą lub mejozą prowadzi do utworzenia się komórek nierównej wielkości (podział asymetryczny), populacja organoidów w siostrzanych komórkach bywa niejednakowo liczna. Najlepiej znanym przykładem jest pierwsza mitozą w rozwoju pyłku. W mikrosporze powstaje wtedy duża komórka wegetatywna, zwykle przejmująca wszystkie plastydy i większość mitochondriów, oraz mała komórka generatywna, zwykle bez plastydów i z niewielką liczbą mitochondriów [16]. Aby do tego doszło, plastydy muszą w pewnym porządku zmieniać położenie przed podziałem mikrospory lub w czasie jej podziału.

CHONDRIOKINEZA

Sposoby rozdzielania się populacji organoidów między tworzące się komórki rozpatrywano przed kilkudziesięciu laty, kiedy często nie można było rozróżnić plastydów od mitochondriów w komórkach mejotycznych i w komórkach innych merystemów, a prócz tego nie wszyscy uznawali ontogenetyczną odrębność obu typów organoidów. Z badań wynikało, że cytoplazmatyczne organoidy mogą prawidłowo zmieniać swoje położenie w dzielących się komórkach. To przemieszczanie się organoidów określono terminem chondriokineza, podobnym do terminu kariokineza. Chondriosomami nazywano te organoidy, które teraz nazywa się mitochondriami.

Chondriokinezę usystematyzował w 1938 r. Bąkowski [1] z krakowskiej pracowni prof. Piecha. System jest dosyć złożony i nie ma potrzeby wchodzić w jego szczegóły. Chondriokineza była tam dzielona na trzy główne typy: obojętny, biegunowy i równikowy (rys. 1).

Organoidy podczas chondriokinezy obojętnej rozmieszczają się mniej więcej równomiernie (przypadkowo) w całej cytoplazmie, ale są wypychane z przestrzeni zajmowanej przez tworzące się wrzeciono mitotyczne, a potem przez wrzeciono cytokinetyczne. Kiedy komórka macierzysta rozdziela się przegrodą, organoidy są w przybliżeniu jednakowo liczne w obu potomnych komórkach.



Rys. 1. Zasadnicze typy chondriokinezy. Organoidy cytoplazmatyczne zaznaczone kropkami; a) chondriokineza obojętna, b) równikowa, c) biegunowa (według Bąkowskiego [1] zmienione)

W typie chondriokinezy biegunowej organoidy grupują się na biegunach wrzeciona mitotycznego lub wcześniej po dwu przeciwległych stronach jądra komórki, gdzie będą te bieguny.

Podczas chondriokinezy równikowej organoidy grupują się z boków płytki metafazowych chromosomów, po czym zajmują całą równikową płaszczyznę komórki, która jest wtedy w stadium telofazowym lub post-telofazowym.

Prócz tych typów wyróżnione były też typy pośrednie i złożone: np. biegunowo — równikowy, obojętno — równikowy i in. System obejmuje chondriokinezę w komórkach somatycznych i mejotycznych, przy czym typy biegunowy i równikowy są szczególnie częste w mikrosporogenezie roślin nasiennych i w sporogenezie paprotników.

PLASTYDY I MITOCHONDRIA A CHONDRIOGENEZA

Zajmiemy się tylko sposobami rozdzielania się populacji plastydów i mitochondriów podczas mejozy w komórkach mchów, paprotników i roślin nasiennych. Przede wszystkim nie ma teraz wątpliwości (jakie były przed kilkudziesięciu laty), że plastydy i mitochondria są oddzielnymi typami organoidów. Wiemy też, że mitochondria mogą się przemieszczać w komórce niezależnie od plastydów i wtedy każdy z tych typów organoidów zajmuje inne, sobie właściwe miejsca, tak jakby były kierowane przez różne centrale ruchu. Termin chondriokineza stał się niezbyt ścisły i dalej obawiamy się go używać.

ORGANOIDY GRUPUJĄ SIĘ PRZY WCZESNOMEJOTYCZNYM JĄDRZE

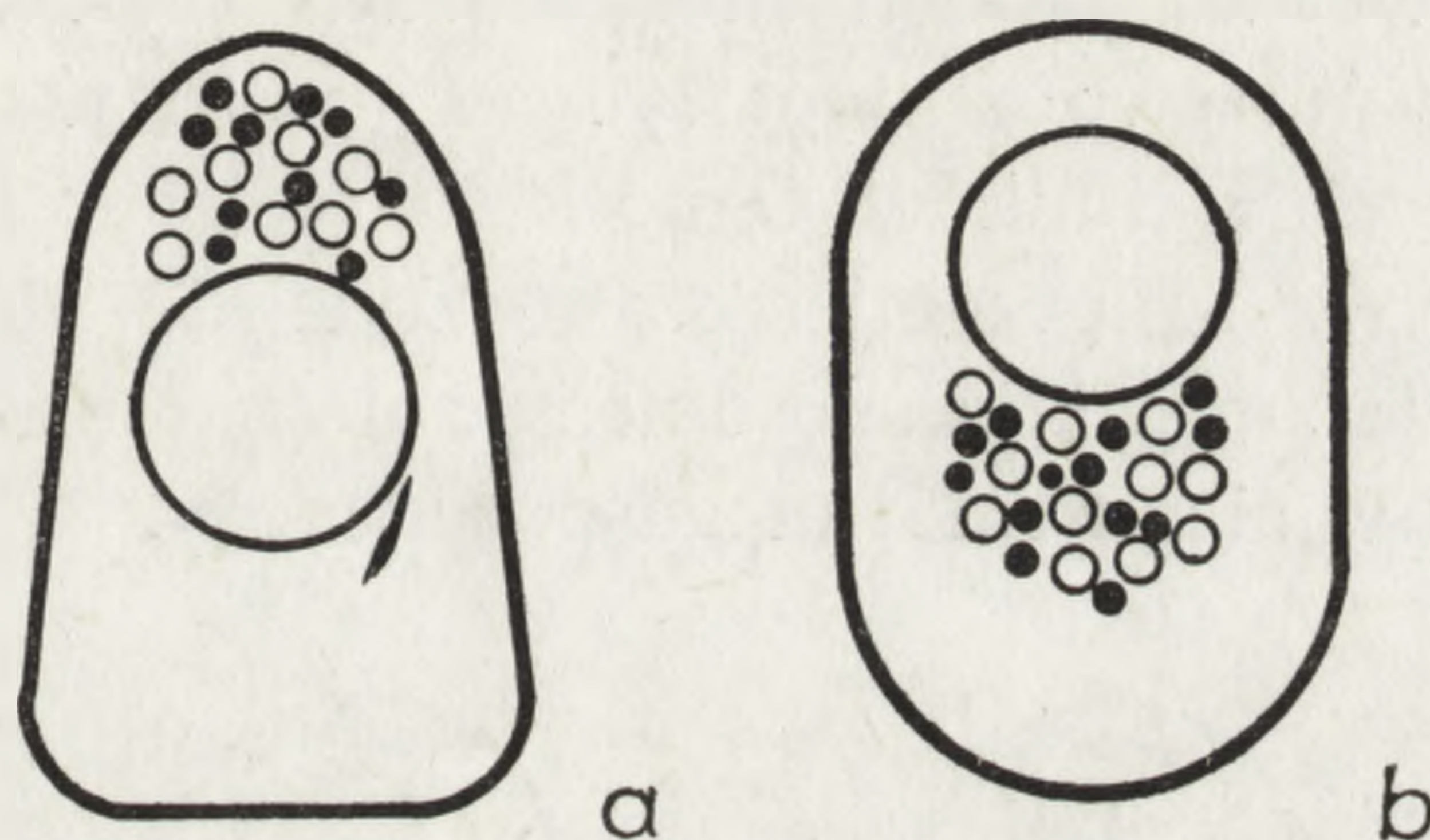
Cytoplazma początkowo diploidalnej komórki mejotycznej przechodzi wiele zmian strukturalnych, które przystosowują ją, według hipotezy rozwijanej przez Dickinsona i Heslopa-Harrisona [14] oraz Dickinsona [11, 12], do działania w metabolizmie haploidalnego gametofitu. Widocznym przejawem tej przebudowy jest daleko posunięte odróżnicowanie się i redukcja struktury plastydów, aż do okresowej utraty obu błon zewnętrznych [26]. Nie jest dla nas jasne, jak te zmiany łączą się z opisaną tutaj agregacją plastydów i mitochondriów.

Plastydy i mitochondria wczesnomejotycznej komórki są rozmieszczone przypadkowo, tj. równomiernie, ale wkrótce po rozpoczęciu pierwszej mejotycznej profazy wszystkie one gromadzą się w jedną grupę położoną przy otoczce jądrowej (rys. 2). Taka grupa organoidów była niedawno opisana w megasporogenezie storczyków [4, 23], w sporocytach ze sporangiów kilku gatunków *Equisetum* [2, 3, 5] oraz w mikrosporocytach z pylników *Impatiens balsamina* i kilku gatunków z rodzaju *Tradescantia* [22]. Na długo przed końcem pierwszej mejotycznej profazy organoidy rozpierzchają się na wszystkie strony i znów plastydy oraz mitochondria zajmują przypadkowe miejsca w komórce.

Nie wiemy, czy zjawisko gromadzenia się plastydów i mitochondriów w początkach mejozy jest powszechne, chociaż wydaje się, że powinno być przynajmniej częste, ponieważ wymienione rośliny pochodzą z różnych grup systematycznych i były wzięte dosyć przypadkowo. Zgrupowanie plastydów i mitochondriów zauważono także w mikrosporocytach lilii [13] oraz mikrosporocytach sosny [24], ale w publikacji [31] jest tylko fotografia zwartej grupy organoidów bez żadnych uwag.

Nie mamy również pojęcia, po co organoidy zbierają się na krótko w określonym miejscu komórki w czasie, kiedy zaczęła się już pierwsza

mejotyczna profaza. Jedyne wniosek jest negatywny; prawdopodobnie wczesnomejotyczne zgrupowanie plastydów i mitochondriów nie ma nic wspólnego z późniejszymi ruchami i rozmieszczeniem tych organoidów w następnych fazach mejozy. Grupa zawsze się rozprasza, a później organoidy w megasporogenezie storczyka zachowują się inaczej niż w mikrosporogenezie w pylnikach *Impatiens* i sporogenezie w sporangiach *Equisetum*, a jeszcze inaczej w mikrosporogenezie w pylnikach *Tradescantia*.



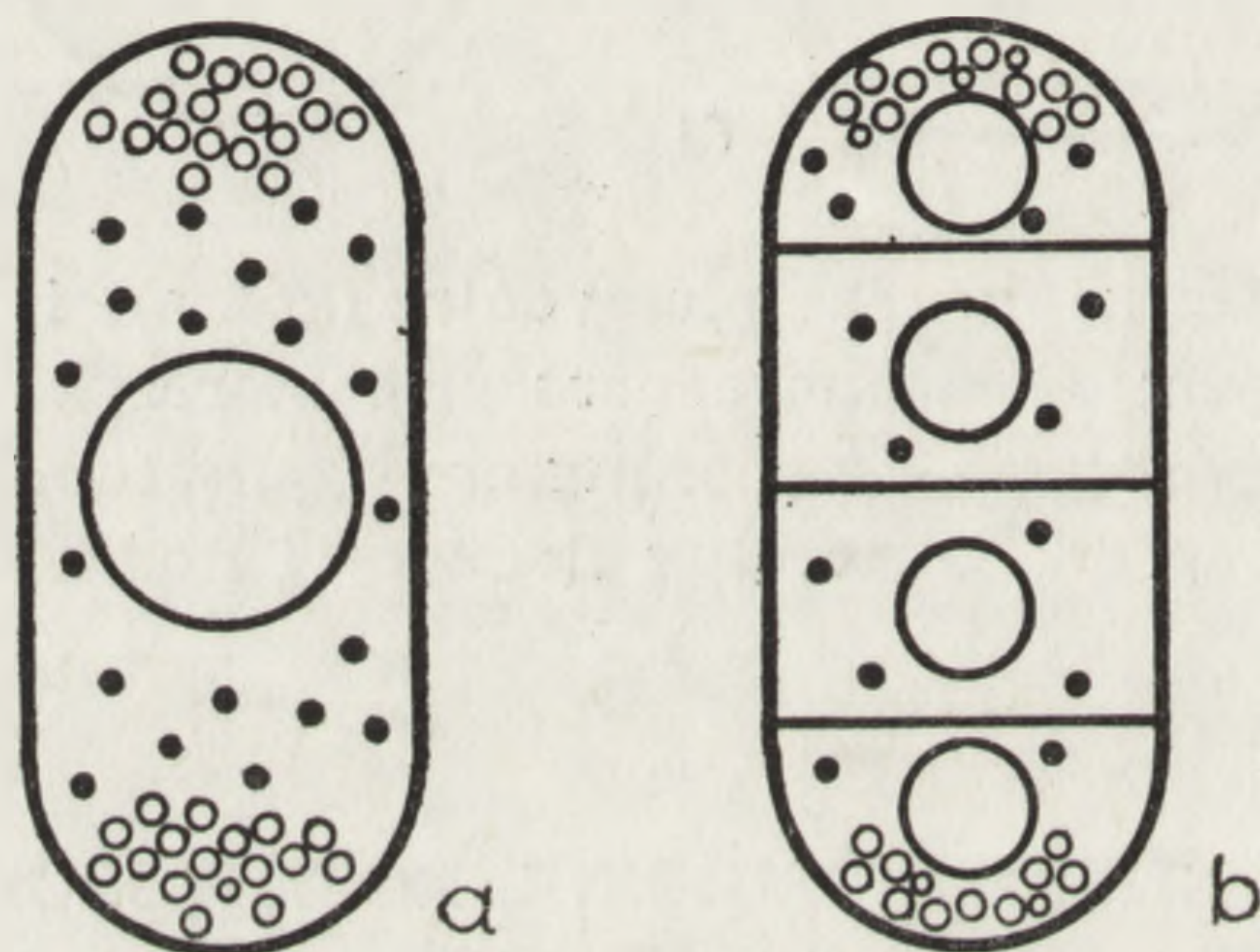
Rys. 2. Wczesnomejotyczna grupa plastydów (kółka) i mitochondriów (kropki) przy jądrze komórkowym; a) w megasporocycie storczyka z rodzaju *Epipactis*; b) w nieco wydłużonym sporocycie ze sporangium *Equisetum*, a) według danych Bednary i wsp. [5], b) według Bednary i Rodkiewicza [4]

RÓWNOMIERNE I NIERÓWNOMIERNE ROZMIESZCZENIE PLASTYDÓW W MEGASPOROGENEZIE

Dotychczas za pomocą mikroskopu elektronowego badano megasporogenezę kilkunastu gatunków roślin. W większości z nich plastydy i mitochondria komórek mejotycznych były rozmieszczone równomiernie, chociaż u wspomnianych storczyków grupują się one przejściowo na mikropylarnym wierzchołku profazowego megasporocytu (ryc. 2a), co nie było dostrzeżone ani opisane w megasporocytach innych gatunków. Równomiernie rozmieszczone organoidy po pierwszym i drugim podziale mejotycznym znajdują się w komórkach diady, a następnie tetrady megaspor *Capsella bursa pastoris* [25.] Znamy od tego przynajmniej kilka wyjątków; w profazowym mejocycie zalążków *Ginkgo biloba* [28] i *Chamaecyparis lawsoniana* [15] organoidy zbierają się w chalazalnym wierzchołku i tam się utrzymują przez całą mejozę, także wszystkie lub przynajmniej większość z nich pozostaje w różnicującej się przy chalazie, funkcjonalnej megasporze, która da początek żeńskiemu gametofitowi. Takie uprzywilejowane megaspory chalazalne wypełnione plastydami wi-

działa też De Sloover [10] za pomocą mikroskopu świetlnego w zalążkach sagowca *Encephalartos poggei*.

Wśród okrytozalążkowych inny, wyjątkowy sposób zachowania się plastydów był opisany w rodzinie *Onagraceae* [17, 21]. Na początku mejozy plastydki zbierają się na dwu wierzchołkach wydłużonego megasporocytu i znajdują się tam do czasu, kiedy utworzy się tetrada megaspor. W rezultacie takiej trwałej lokalizacji tylko megaspory wierzchołkowe (chalazalna i mikropylarna) zawierają plastydki. Mitochondria natomiast nie wędrowały razem z plastydami do wierzchołków profazowego megasporocytu i są we wszystkich megasporach (rys. 3). Taki nierówny rozdział plastydów ma swoje hipotetyczne skutki w rozwoju żeńskiego gametofitu niektórych gatunków *Oenothera* (referat [20]), a prócz tego pokazuje, że plastydki są przemieszczane zupełnie niezależnie od mitochondriów, które nie zmieniają sposobu rozmieszczenia i są dosyć równomiernie rozrzucone w ciągu całej megasporogenezy.



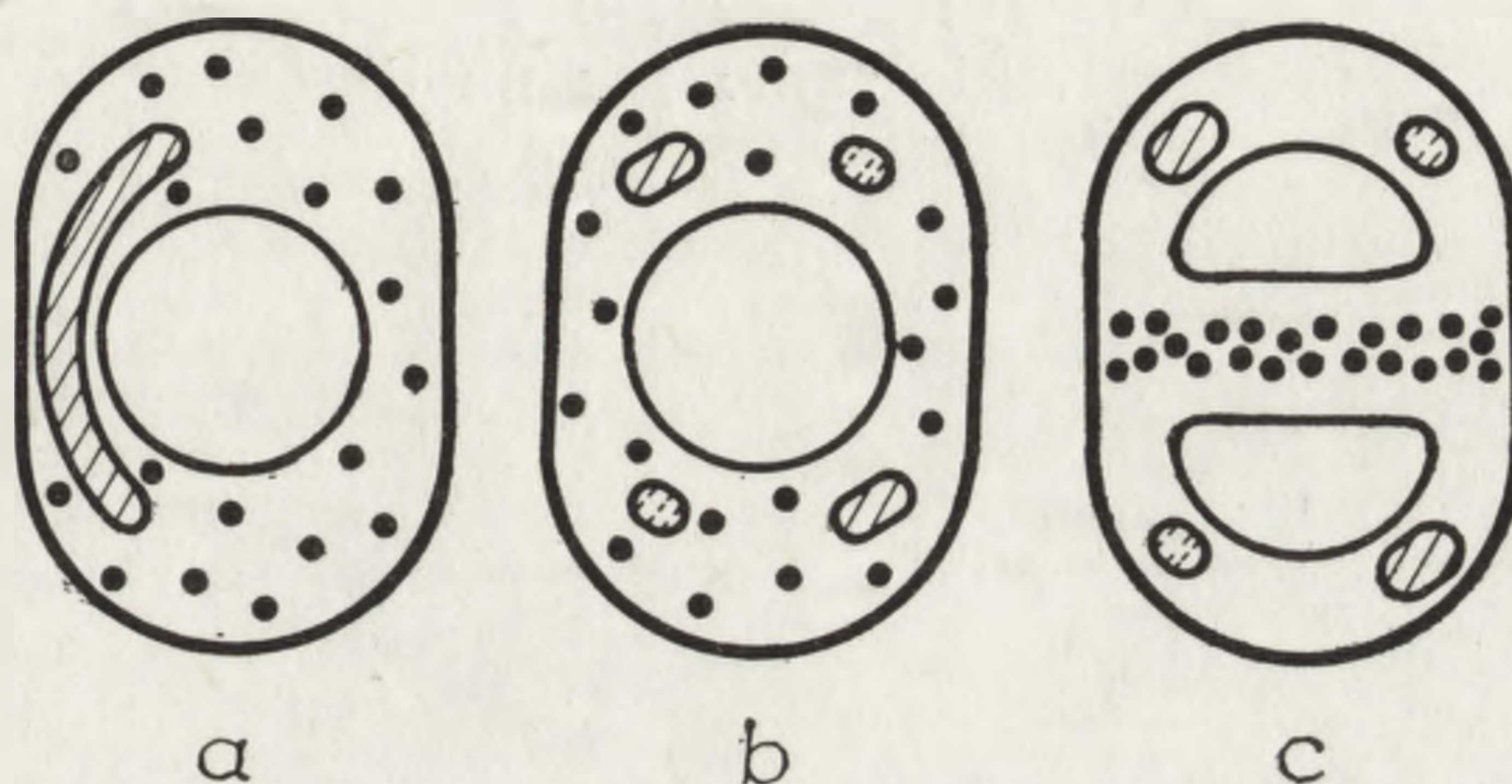
Rys. 3. Rozmieszczenie plastydów (kółka) i mitochondriów (kropki) w megasporogenezie *Epilobium* (*Onagraceae*); a) megasporocyt, plastydki zebrane na wierzchołkach; b) tetrada megaspor, plastydki w megasporach wierzchołkowych, mitochondria we wszystkich (według Rodkiewicza i wsp. [21])

PRZEMIESZCZANIE SIĘ ORGANOIDÓW W SPOROGENEZIE NIEKTÓRYCH MCHÓW

Sporocyty w zarodniach mchów z rodzajów *Rynhostegium* i *Amblystegium* mają po jednym dużym plastydzie, który w okresie pierwszej mejotycznej profazy dzieli się dwukrotnie. Cztery potomne plastydki układają się, przy jakiejś pomocy systemu mikrotubularnego, w czterech przeciwległych miejscach sporocytu, tak że po drugim podziale mejotycznym każdy zarodnik (spora) ma po jednym plastydzie. W późnej, pierwszej profazie cztery plastydki niejako przewidują przestrzenny układ zarodników tetrady i nadają sporocytowi czterobiegunową polaryzację, zu-

pełnie niezależną od dwubiegunowej polaryzacji wrzecion podziałowych pierwszego i drugiego podziału mejotycznego.

W trakcie pierwszej telofazy i później plastydy pozostają nieruchome, a mitochondria, dotychczas rozrzucone w całej cytoplazmie, przesuwa-
ją się do równikowej płaszczyzny sporocytu i układają się w płytkowa-
ty agregat (rys. 4), który trwa tam do końca drugiego podziału mejo-



Rys. 4. Plastydy i mitochondria w sporogenezie mchu *Amblystegium*; plastydy zakreskowane, mitochondria zaczernione; a) wczesna komórka mejotyczna z jednym plastydem; b) późna pierwsza profaza mejotyczna, cztery plastydy — w rzeczywistości są one w różnych płaszczyznach komórki; c) mejocyt po pierwszej telofazie, mitochondria zebrane w płaszczyźnie równikowej, plastydy na tych samych miejscach co pod koniec profazy (według Brown i Lemmon [7], zmienione)

tycznego. Po tym następuje równoczesna cytokineza, podczas której zakładające się przegrody pierwotne rozdzielają warstwę mitochondrialną mniej więcej równomiernie między cztery zarodniki powstałe ze sporocytu [7-9]. Widzimy więc, że podczas sporogenezy tych mchów plastydy i mitochondria przemieszczają się w cytoplazmie niezależnie.

PRZEMIESZCZANIE SIĘ ORGANOIDÓW W SPOROGENEZIE *EQUISETUM*

Przyjądrowa grupa mitochondriów i plastydów (tab. 1 a) rozprasza się już we wczesnej, pierwszej profazie mejotycznej i organoidy te trwają w takim układzie prawie do końca pierwszej profazy (tab. 1 b, e). Wtedy mitochondria i plastydy gromadzą się na dwu przeciwległych stronach jądra komórkowego w miejscach, gdzie później znajdują się wierzchołki wrzeciona, lub być może gromadzą się trochę później już przy wierzchołkach tworzonego wrzeciona. Te plastydowo mitochondrialne grupy przesuwa-
ją się następnie do równika i układają się przy brzegu komórki, której środek zajmuje aparat kinetyczny (tab. 1 c). W późnej, pierwszej telofazie mitochondria i plastydy rozprzestrzeniają się w całej płaszczyźnie równikowej, tworząc warstwę (tab. 2a), która rozdziela diadę na dwie części (tab. 1 d, f). Warstawa organoidów trwa przez okres interkinezy i przez cały drugi podział mejotyczny. Podczas drugiej te-

TABELA 1

a-f — sporogeneza *Equisetum hyemale* \times 1400; a-d — preparaty po reakcji PAS; e,f — półcienki preparaty barwione błękitem toluidyny. a — wczesna pierwsza profaza meiotyczna, plastydy (ze skrobią) i niewidoczne na zdjęciu mitochondria zebrane przy jądrze; b — nieco starsza komórka, organoidy rozrzucone dookoła jądra; c — organoidy zebrane na brzegach metafazowego wrzeciona, w środku widać małe chromosomy; d — organoidy w płytce równikowej po pierwszej telofazie; e — komórka w stadium zbliżonym jak na b; f — stadium takie samo jak na d

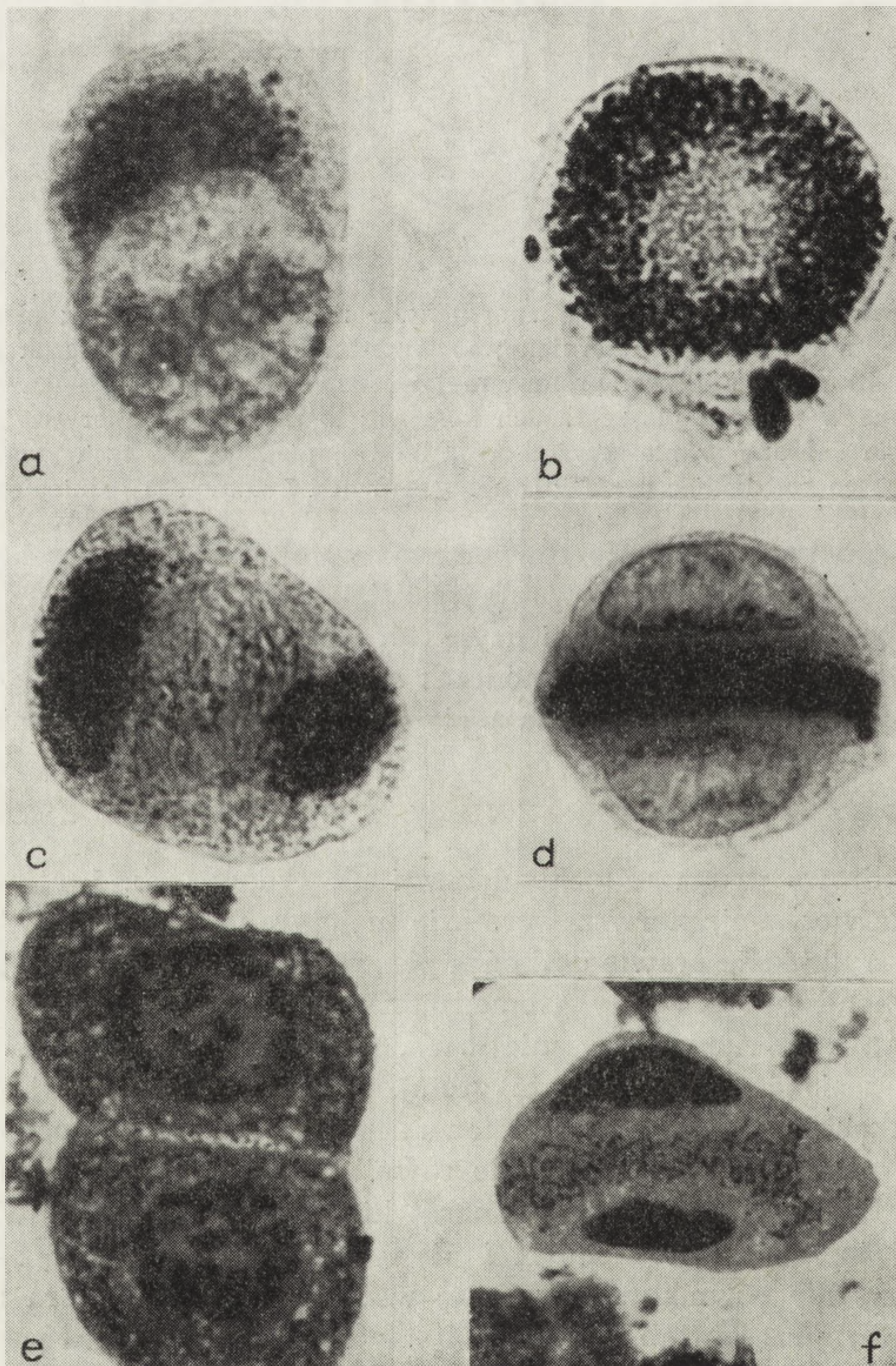
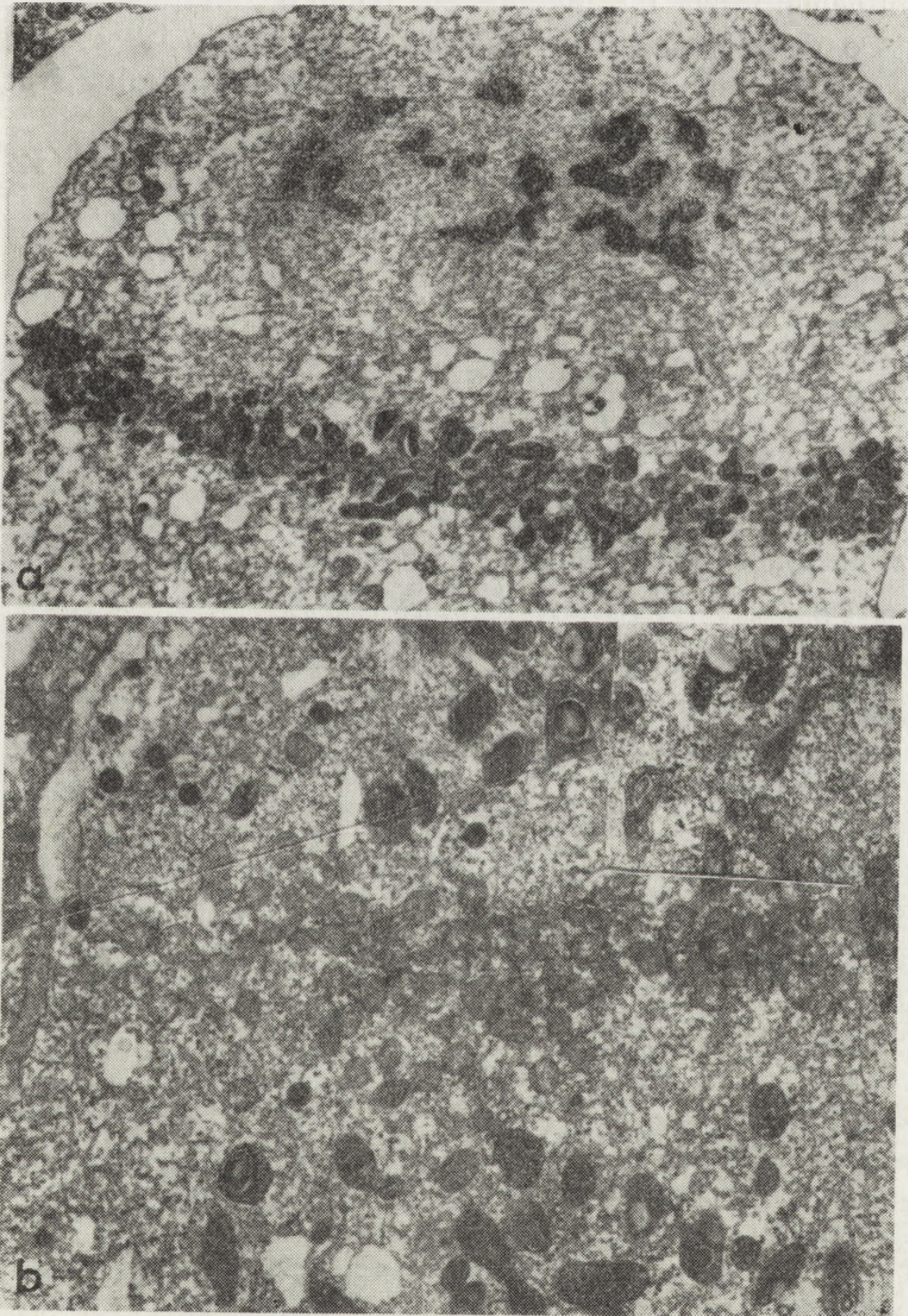


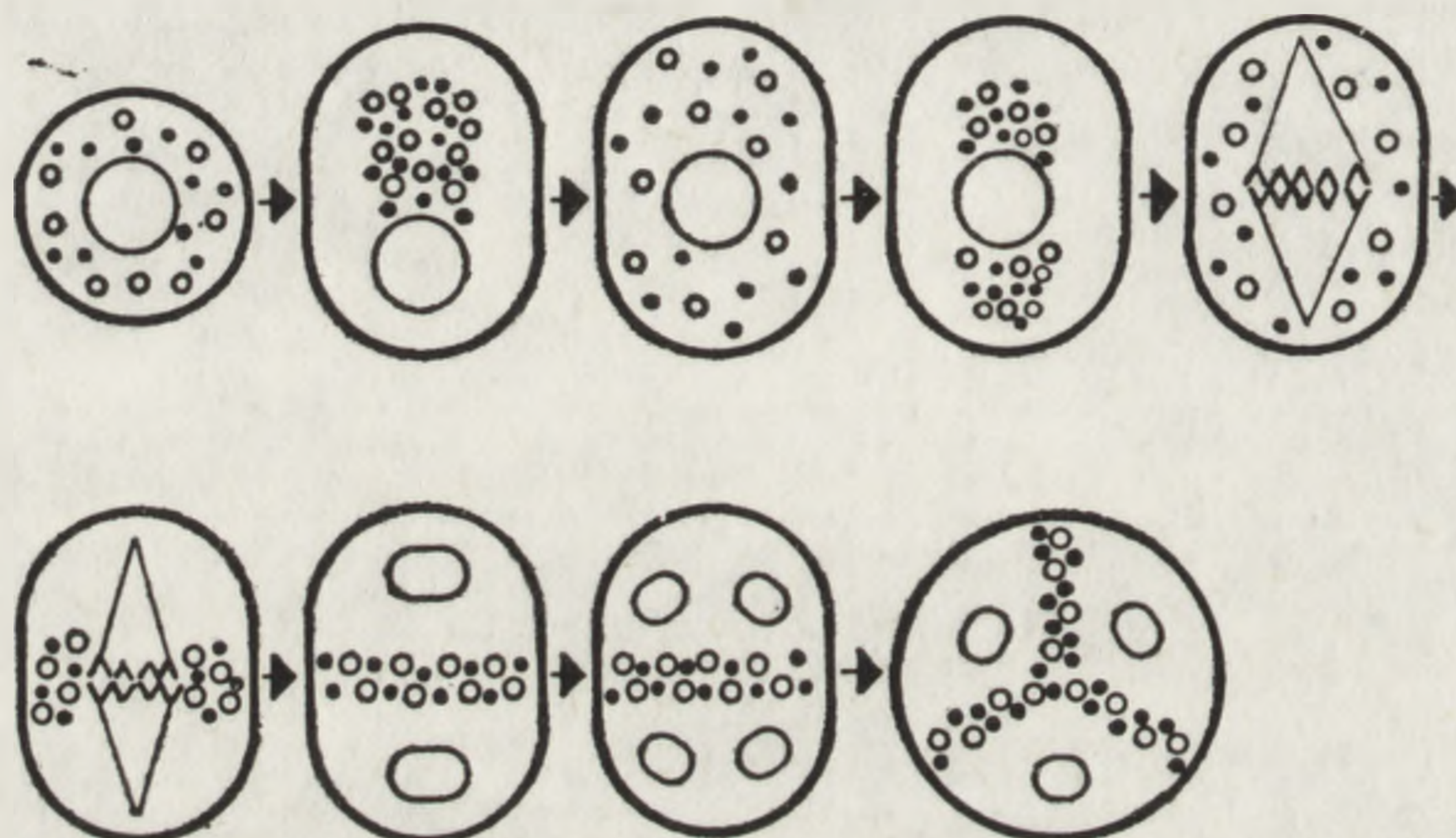
TABELA 2

Mejocyt *Equisetum hyemale*; a — w stadium po pierwszej telofazie, mitochondria i plastydy zebrane w płaszczyźnie równikowej, $\times 3600$; b — w późniejszym stadium warstwa organoidów zróżnicowana na pokład mitochondrialny okryty z dwu stron luźno ułożonymi plastydami, $\times 8000$



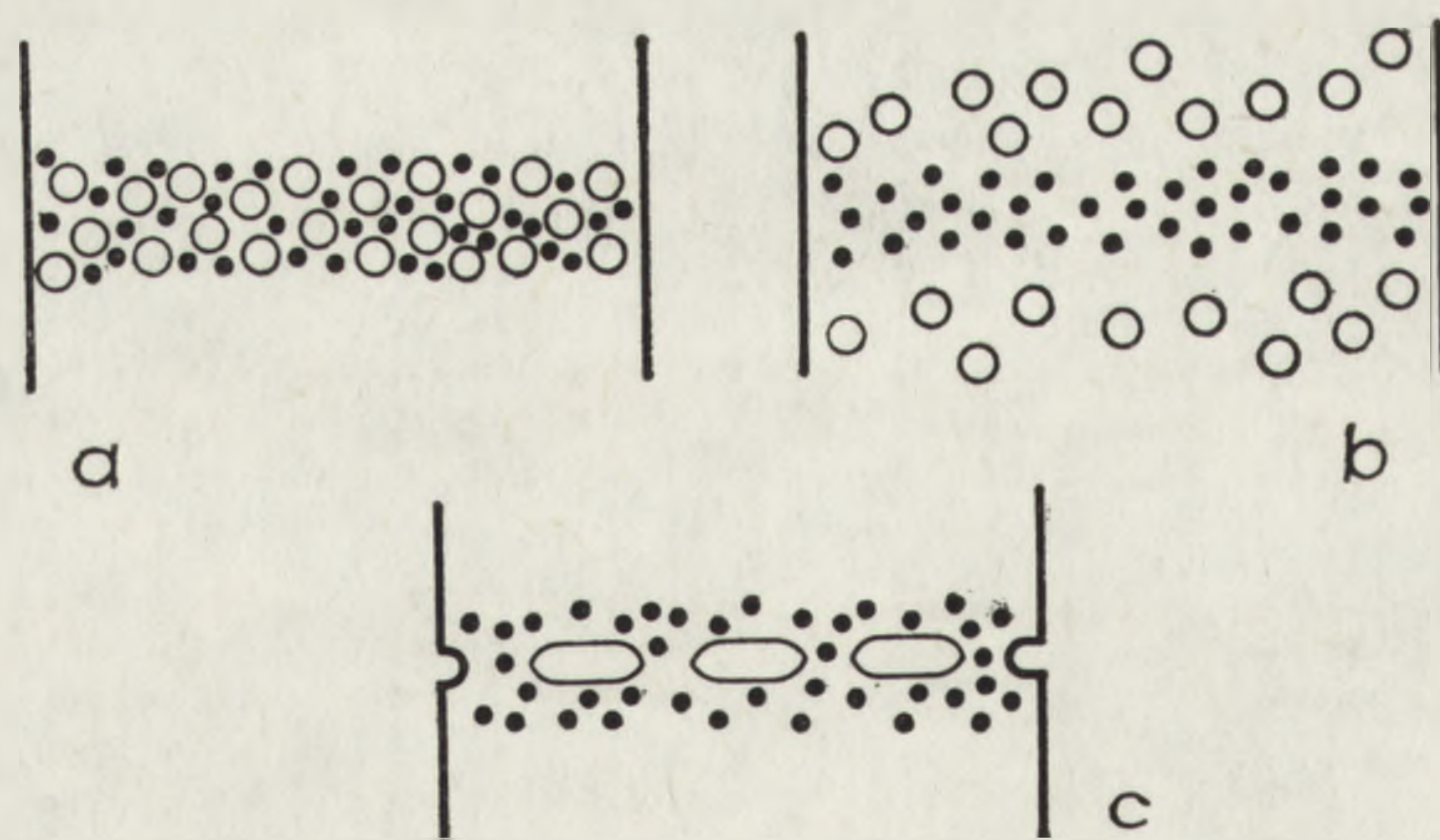
lofazy organoidy się przegrupowują i zajmując także równikowe przestrzenie między parami jąder telofazowych, rozdzielają obszar tetrady na cztery równe części; rys. 5 pokazuje rozkład organoidów w ciągu całej mejozy.

Mitochondria i plastydy w warstwie równikowej są początkowo ułożone bezładnie (tab. 2a), ale porządkują się jeszcze przed drugim podziałem mejotycznym. Warstwa różnicuje się na pokład środkowy, złożony z mitochondriów i otulające go z obu stron pokłady plastydów (tab. 2b). Po drugiej telofazie plastydy przemieszczają się w głąb cytoplazmy, a mitochondria zostają na miejscu. Wtedy wzdłuż środka war-



Rys. 5. Zmiany położenia plastydów i mitochondriów podczas sporogenezy skrzypu *Equisetum hyemale* (według Bednary i wsp. [3])

stwy mitochondriów pojawiają się pęcherzyki, które rozpoczynają budowę przegrody pierwotnej (rys. 6). Mitochondria przez jakiś czas przylegają do przegrody pierwotnej, a następnie przesuwiają się do wnętrza komórek tetrady [2-4].



Rys. 6. Schematy zrobione ze zdjęć w mikroskopie elektronowym; sporogeneza *Equisetum hyemale*; a) plastydy (kółka) i mitochondria (kropki) zebrane podczas pierwszej telofazy w warstwę równikową; b) warstwa równikowa zróżnicowana na pokład środkowy złożony głównie z mitochondriów i pokładów brzeżnych; c) pod koniec drugiej telofazy mejotycznej w strefie mitochondriów zakłada się przegroda pierwotna

Na preparatach z innych obiektów niż *Equisetum* nie zauważono wszystkich tych prawidłowych zmian położenia organoidów podczas mejozy. Kilkakrotnie jednak opisano równikową agregację plastydów i mitochondriów w sporogenezie roślin należących do gatunków z różnych grup systematycznych.

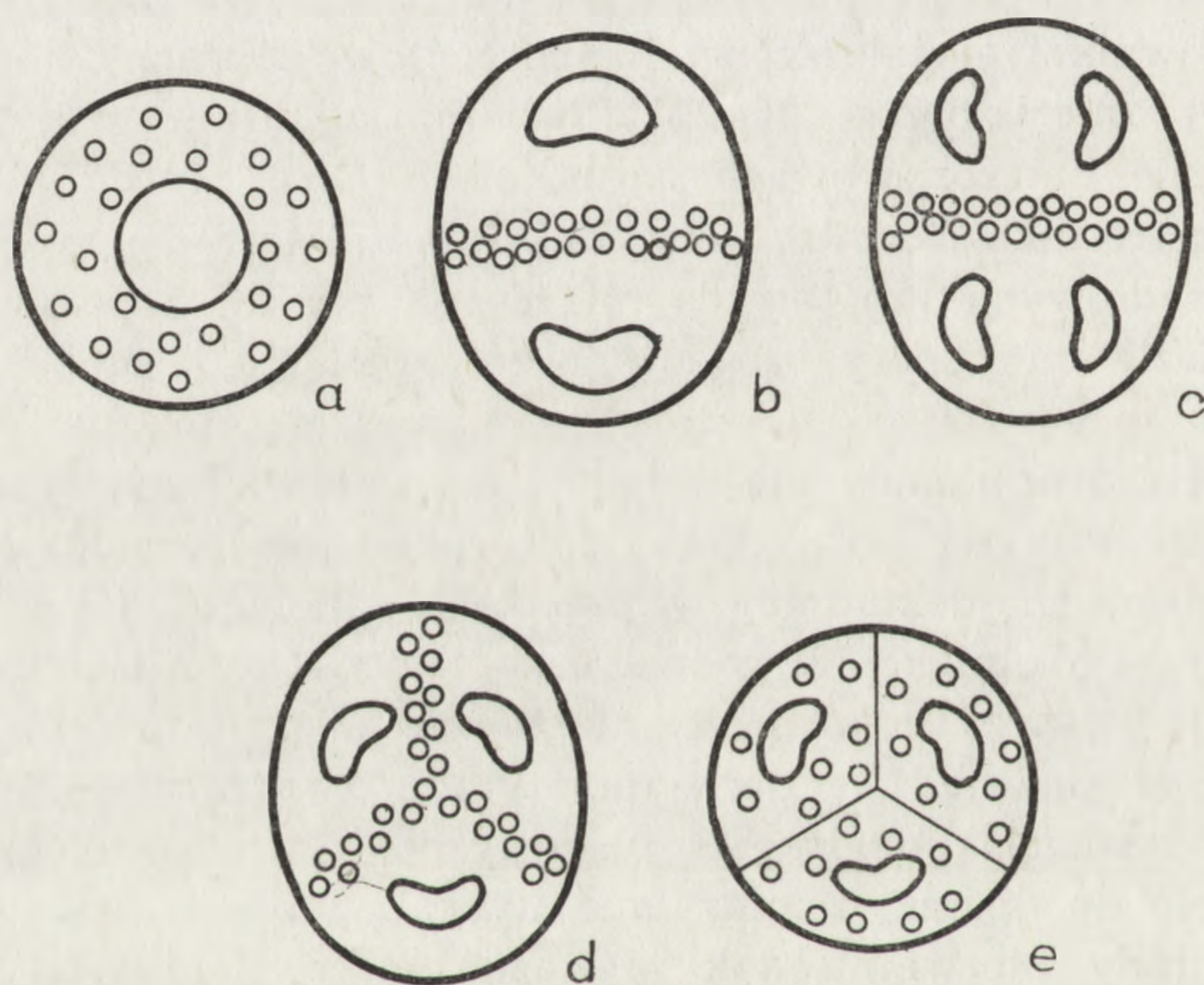
RÓWNIKOWE UKŁADY ORGANOIDÓW W MEJOZIE PAPROCI I ROŚLIN NASIENNYCH

Płytkowate skupienie plastydów i mitochondriów tworzy się w płaszczyźnie równikowej telofazowych sporocytów paproci *Onoclea sensibilis* [19], *Dryopteris borrei* [26, 27], *Pteridium aquilinum* [26] oraz w megasporogenezie heterosporowego gatunku *Marsilea vestita* [6]. Tetrada megaspor paprotnika *Marsilea* przypomina raczej tetradę zarodników paproci homosporowych lub tetradę mikrospor, ponieważ po synchronicznej cytokinezie megaspory są ułożone tetraedralnie, a nie liniowo jak w tetradach megaspor roślin, które wymienialiśmy już tu. W rozwoju liniowych tetrad organoidy nie układają się w równikowe warstwy.

Przemieszczanie się plastydów i mitochondriów w mikrosporogenezie było opisane najdokładniej w pręcikach miłorzębu (*Ginkgo biloba*) badanych przez Wolniak [32] w mikroskopie świetlnym i elektronowym. Organoidy te są przypadkowo rozmieszczone w profazowym mikrosporocycie, ale po pierwszej telofazie mejotycznej tworzą gęstą, grubą warstwę, która rozdziela komórkę w płaszczyźnie równikowej. Warstwa ta utrzymuje się do drugiej telofazy mejotycznej i wtedy jest rozdzielana przez przegrody pierwotne, tak że każda mikrospora tetrady dostaje mniej więcej taką samą liczbę organoidów. Wolniak przypuszcza, że właśnie organoidy skupione w jedną warstwę mogą być łatwiej równo rozdzielone między komórki niż organoidy, które są rozrzucone. Podobna warstwa organoidów była zauważona w pierwszej telofazie podczas mikrosporogenezy w pręcikach nagozalążkowej rośliny *Podocarpus macrophylla* [30].

Jedyną rośliną okrytozalążkową, w której opisano przegrupowania organoidów w mikrosporogenezie, podobne jak w sporogenezie *Equisetum*, jest *Impatiens balsamina* [22]. Mikrosporocyty tej rośliny zawierają plastydy ze skrobią i dlatego można je łatwo wyjawić po zabarwieniu skrobi na preparatach w mikroskopie świetlnym. Plastydy te w zaawansowanej pierwszej profazie mejotycznej są rozrzucone w całej cytoplazmie, a gromadzą się wszystkie w równikowej warstwie pod koniec pierwszej telofazy. Po drugiej telofazie warstwa ta zmienia kształt i rozdziela tetradę na cztery części ułożone tetraedralnie. Wzdłuż środków warstw

rozdzielających zakładają się przegrody pierwotne, które ostatecznie wyodrębniają mikrospory tetrady (rys. 7). Przypuszczamy, że tak jak u *Equisetum* i *Ginkgo*, w równikowej warstwie organoidów oprócz plastydów (tutaj amyloplastów) są też mitochondria. Jest to prawdopodobne, ponieważ zdjęcie z mikroskopu elektronowego, zrobione przez Takahashi i Sohuma [29] przy badaniu mikrosporogenezy u *Pyrola japonica*, pokazuje duże skupienie plastydów i mitochondriów między czterema jądrami po drugiej telofazie mejotycznej; autorzy jednak tego nie omawiają. Podobne skupienie opisuje Dupuis [33] w mikrosporocytach *Impatiens balsamina*, jednak sugeruje ona zupełnie inną interpretację niż nasza.



Rys. 7. Mikrosporogeneza w pylnikach *Impatiens balsamina*; stadia od późnej pierwszej profazy mejotycznej do tetrady, wczesna profaza pokazana na rys. 2b, pokazane rozmieszczenie plastydów i prawdopodobne rozmieszczenie mitochondriów (według Rodkiewicza i wsp. [22] zmienione)

AMYLOPLASTY W MIKROSPOROGENEZIE Z SUKCESYWNĄ CYTOKINEZĄ

Inaczej niż u *Impatiens* rozmieszczają się amyloplasty podczas mikrosporogenezy w pręcikach trzykrotki (*Tradescantia*). Początkowo jednak nic na to nie wskazuje, bo we wczesnomejotycznych mikrosporocytach amyloplasty skupiają się przy jądrze komórkowym (rys. 2), po tym grupa się rozprasza, ale w pierwszej telofazie prawie wszystkie amyloplasty i mitochondria układają się w całej szerokiej przestrzeni między jądrami komórkowymi. Przez tę warstwę zakłada się wrzeciono cytokinetyczne i wtedy organoidy odsuwają się lub raczej są spychane w kie-

runku jąder komórkowych, toteż przegroda pierwotna buduje się w szerokim pasmie optycznie pustej cytoplazmy.

Po pierwszej telofazie organoidy otaczają jądra komórkowe diady, a podczas drugiego podziału mejotycznego układy organoidów powtarzają się znowu — amyloplasty zbierają się między telofazowymi jądrami tetrady i odbywa się cytokineza tak jak przy tworzeniu się diady — cytokineza sukcesywna [22].

RÓWNIKOWE WARSTWY ORGANOIDÓW POPRZEDZAJĄ CYTOKINEZĘ RÓWNOCZESNĄ

Podczas pierwszej telofazy mitochondria i plastydy lub tylko mitochondria układają się w równikowej płaszczyźnie mejocytów rozmaitych roślin wyższych, zawsze jednak są to mejocyty, które ostatecznie dzielą się za pomocą cytokinezy równoczesnej. Nie widziano natomiast takich warstw w mejozie z cytokinezą sukcesywną. Warstwa organoidów zatem odgradza w diadzie posttelofazowe jądra, które następnie przechodzą synchronicznie drugi podział mejotyczny. Można przypuszczać, że bez odgraniczającej warstwy wrzeczona kinetyczne drugiej metafazy łatwo by się łączyły, co burzyłoby prawidłowy wynik mejozy, a w dalszych skutkach obniżało płodność organizmu. Warstwa organoidów zastępuje więc przegrodę pierwotną w tych komórkach mejotycznych, gdzie po pierwszej telofazie nie działa mechanizm cytokinezy, tj. w sporogenezie z cytokinezą równoczesną po drugim podziale mejotycznym.

W okresie drugiej telofazy warstwa organoidów rozbudowuje się i rozdziela mejocyty (*Equisetum* i *Impatiens*) na cztery obszary zamieniające się w cztery komórki tetrady, kiedy w mitochondrialnym pokładzie warstwy organoidów utworzy się przegroda pierwotna.

W mikrosporogenezie paru zbadanych przez Longly i Waterkeyn [18] gatunków roślin okrytozalążkowych przegrody pierwotne, powstające po cytokinezie równoczesnej, różnią się budową od przegród powstałych w cytokinezie sukcesywnej. Przyczyną tych różnic mogą być odmienne warunki w strefie tworzenia się przegród. W pierwszym przypadku przegroda pierwotna zakłada się wśród mitochondriów zebranych w warstwie równikowej, w drugim — w optycznie pustej cytoplazmie, daleko od odsuniętych wcześniej mitochondriów.

Nie możemy powiedzieć, dopóki nie będzie więcej dowodów, czy rzeczywiście powszechnie mitochondria i plastydy w mejocytach grupują się na pewien czas przy wczesnoprofazowym jądrze, oraz czy zawsze organoidy zbierają się w równikową warstwę po pierwszej mejotycznej telofazie sporogenezy z cytokinezą równoczesną.

LITERATURA

- [1] BAŁOWSKI Z., Versuch einer Klassifizierung der Chondriokinese bei Kormophyten, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **15**: 323-368, 1938.
- [2] BEDNARA J., GIEŁWANOWSKA I., Plastydy i mitochondria w czasie mejozy u *Equisetum hyemale*, *E. limosum*, *E. palustre* i *E. variegatum* [w] II ogólnopolska konferencja embriologów roślin, UJ Kraków 1984, stresz. 22.
- [3] BEDNARA J., GIEŁWANOWSKA I., KUDLICKA K., RODKIEWICZ B., STOBIECKA H., Prawidłowe zmiany rozmieszczenia plastydów i mitochondriów w sporogenezie *Equisetum* i w pylnikach *Impatiens*, *Tradescantia* i *Larix*, [w] III ogólnopolska konferencja. Mechanizmy regulacji morfogenezy układów roślinnych, red. T. J. Wodzicki, SGGW-AR, Warszawa 1984, 128-129.
- [4] BEDNARA J., KURAS M., RODKIEWICZ B., Ultrastructural changes during megasporogenesis in *Epipactis* (*Orchidaceae*), *Acta Soc. Bot. Pol.*, **50**: 127-130, 1981.
- [5] BEDNARA J., RODKIEWICZ B., Distribution of plastids and mitochondria during sporogenesis in *Equisetum*, [w] Intern. Symp. on sexual reproduction in seed plants, ferns and mosses, red. M. T. M. Willemsse, Agr. Univ., Wageningen 1984 (w druku).
- [6] BELL P. R., Megasporogenesis in a heterosporous fern: features of the organelles in meiotic cells and young megaspores, *Jour. Cell Sci.*, **51**: 109-119, 1981.
- [7] BROWN R. C., LEMMON B. E., Ultrastructural aspects of moss meiosis: cytokinesis and organelle apportionment in *Rhynchostegium serrulatum*, *Jour. Hattori Bot. Lab.*, **53**: 41-50, 1982.
- [8] BROWN R. C., LEMMON B. E., Ultrastructure of meiosis in the moss *Rhynchostegium serrulatum*. I prophase microtubules and spindle dynamics, *Protoplasma*, **110**: 23-33, 1982.
- [9] BROWN R. C., LEMMON B. E., Ultrastructure of sporogenesis in the moss *Amblystegium riparium*. I meiosis and cytokinesis, *Amer. Jour. Bot.*, **69**: 1096-1107, 1982.
- [10] DE SLOOVER J. L., Etude sur les Cycadales. I. Méiose et mégasporogénèse chez *Encephalartos poggei* Asch., *Cellule*, **32**: 105-116, 1961.
- [11] DICKINSON H. G., Cytoplasmic differentiation during microsporogenesis in higher plants, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **50**: 3-12, 1981.
- [12] DICKINSON H. G., The development of pollen, *Rev. Cytol. Biol. végét. Bot.*, **5**: 5-19, 1982.
- [13] DICKINSON H. G., ustna informacja, 1984.
- [14] DICKINSON H. G., HESLOP-HARRISON J., Ribosomes, membranes and organoids during meiosis in angiosperms, *Phil. Trans. R. Soc. London, B*, **277**: 327-342, 1977.
- [15] FIORDI A. C., MAUGINI E., On megasporogenesis in *Chamaecyparis lawsoniana* Pach., *Caryologia*, **30**: 77-96, 1977.
- [16] HAGEMANN R., Unequal plastid distribution during development of the male gametophyte of angiosperms, *Acta Soc. Bot. Pol.*, **50**: 321-327, 1981.
- [17] JALOUZOT M-F., Aspects ultrastructureaux de la mégasporogénèse d'*Oenothera lamarckiana* en rapport avec les dépôts callosiques observés, *Ann. Univ. ARERS Reims*, **9**: 36-45, 1971.
- [18] LONGLY B., WATERKEYN L., Etude de la cytocinèse. II. Structure et isolement des plaques cellulaires microsporocytaires, *Cellule*, **72**: 227-242, 1978.

- [19] MARENGO N. P., Ultrastructural features of the dividing meiocyte of *Onoclea sensibilis*, Amer. Jour. Bot., **64**: 600-601, 1977.
- [20] RODKIEWICZ B., BEDNARA J., KURAŚ M., Przejawy biegunowości w komórkach mejotycznych i pomejotycznych, [w] III ogólnopolska konferencja. Mechanizmy regulacji morfogenezy układów roślinnych, red. T. J. Wodzicki, SGGW-AR, Warszawa 1984, 65-87.
- [21] RODKIEWICZ B., BEDNARA J., SNIEŻKO R., Polarizacja kłetek v megasporogeneze u *Onagraceae*, Bot. Żur., **61**: 905-909, 1976.
- [22] RODKIEWICZ B., KUDLICKA K., STOBIECKA H., Patterns of amyloplasts localization during microsporogenesis in *Tradescantia*, *Impatiens* and *Larix*, Acta Soc. Bot. Pol., (w druku) 1984.
- [23] RODKIEWICZ B., STOBIECKA H., Distribution of starch grains in the meiocytes and megaspores of *Orchis* and *Epipactis*, Bull. Acad. Pol., Sci., **26**: 107-110, 1978.
- [24] ROWLEY J. R., Ustna informacja, 1984.
- [25] SCHULZ P. J., Ultrastructure and ultrachemical localization of acid phosphatase in the dyad, tetrad and developing megaspore of *Capsella*, [w] Intern. Symp. on sexual reproduction in seed plants, ferns and mosses, red. M. T. M. Willemse, Agr. Univ., Wageningen 1984, w druku.
- [26] SHEFFIELD E., BELL P. R., Ultrastructural aspects of sporogenesis in a fern *Pteridium aquilinum* (L) Kuhn., Ann. Bot., **44**: 392-405, 1979.
- [27] SHEFFIELD E., LAIRD S., BELL P. R., Ultrastructural aspects of sporogenesis in the apogamous fern *Dryopteris borrei*, Jour. Cell Sci., **63**: 125-134, 1983.
- [28] STEWART K. P., GIFFORD F. M., Ultrastructure of developing megaspore mother cell of *Ginkgo biloba*, Amer. Jour. Bot., **54**: 375-383, 1967.
- [29] TAKAHASHI H., SOHUMA K., Pollen development in *Pyrola japonica* Kleuze, Sci. Rep. Tohoku Univ. Biol., **38**: 57-71, 1980.
- [30] VASIL I. K., ALDRICH H. C., A histochemical and ultrastructural studies of the ontogeny and differentiation of pollen in *Podocarpus macrophylla* D. Don., Protoplasma, **71**: 1-37, 1970.
- [31] WALLEES B., ROWLEY J. R., Cell differentiation in microsporangia of *Pinus sylvestris* with special attention to the tapetum. I. The pre-and early-meiotic periods, Nord. Jour. Bot., **2**: 53-70, 1982.
- [32] WOLNIAK S. M., Organelle distribution and apportionment during meiosis in the microsporocyte of *Ginkgo biloba*, Amer. Jour. Bot., **63**: 251-258, 1976.
- [33] DUPUIS F., Étude ultrastructurale de la microgamétogenèse chez l'*Impatiens balsamina* L.: de la diade à la tétrade, Bul. Soc. bot. France **125**, Actualités Bot., **1/2**: 19-22, 1978.

Otrzymano: 23 listopada 1984.

Przyjęto: 4 grudnia 1984.

Adres autorów: Akademicka 19, 20-033 Lublin.

KOMUNIKAT

Druga Ogólnopolska Konferencja Biologii Komórki odbędzie się w Warszawie w dniach 18-20 września 1985 r.

Program Konferencji będzie obejmował referaty plenarne, doniesienia plakatowe i dyskusje okrągłego stołu z wszystkich specjalności biologii komórki.

Organizatorami Konferencji są: Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, prezydium problemu MR. II. 1., i Komitet Cytobiologii PAN.

Osoby zainteresowane Konferencją proszone są o przesłanie wstępnego zgłoszenia pod adresem:

Leszek Kuźnicki, Instytut im. M. Nenckiego,
02-093 Warszawa, ul. Pasteura 3.

Zgłoszenie powinno zawierać

1. Imię i nazwisko autora (autorów) plakatu
2. Adres uczelni (placówki)
3. Tytuł (temat) plakatu

Osoby, które prześlą wstępne zgłoszenie, otrzymają kolejne komunikaty pocztą.

OBSZARY JĄDERKOTWÓRCZE (NOR) W BADANIACH CYTOGENETYCZNYCH

THE NUCLEOLUS ORGANIZER REGIONS (NOR) IN CYTOGENETIC STUDIES

Anna ROKICKA

Katedra i Zakład Ogólnej Biologii Lekarskiej Śląskiej Akademii Medycznej
w Katowicach

Streszczenie. Praca ta jest przeglądem informacji na temat struktury i funkcji organizatorów jąderkowych (NOR) w genomie Eukaryota. Obszary te, stanowiące niewielki odsetek genomu, różny w poszczególnych gatunkach, zawierają zespół cistronów kodujących 18S i 28S rRNA. Lokalizację oraz aktywność transkrypcyjną NOR bada się za pomocą hybrydyzacji H³rRNA/DNA i autoradiografii, prążków N i srebrzenia. Rozpowszechniony jest pogląd, w myśl którego w chromosomach metafazowych wysrebrzają się te obszary NOR, które były aktywne podczas poprzedzającej podział interfazy. Ostatnie badania sugerują jednak, iż są to NOR, które będą mogły podjąć proces transkrypcji dopiero w następnym cyklu komórkowym. Zwrócono uwagę na zróżnicowanie międzykomórkowe, międzyosobnicze i międzygatunkowe obszarów NOR oraz różną częstość występowania i składu asocjacji satelitarnych (AS) u człowieka.

Summary: The structure and function of nucleolar organizer regions (NOR) in the genome of Eukaryota are reviewed on the basis of the data from the literature. NOR carry the structural genes for 18S and 28S ribosomal RNA and constitute a relatively small part of the genome, various from one species to the other. The location and the activity of the NOR are studied by in situ hybridization, autoradiography, N-banding and silver staining methods. So far, the silverstainability of these regions at metaphase was held to be determined by transcriptional activity of the ribosomal RNA genes during the preceding interphase. Recently it has been suggested, however, that the pattern of Ag-stainability of the NOR depends on the state of the rDNA during the next interphase. The correlation between NOR activity and satellite associations in man as well as their interspecies, — subjects and-cells variation were also discussed.

W genomie każdego gatunku organizmów wyższych występują obszary odpowiedzialne za strukturę i organizację jąderek podczas cyklu komórkowego. Głównym składnikiem tych obszarów są odcinki DNA

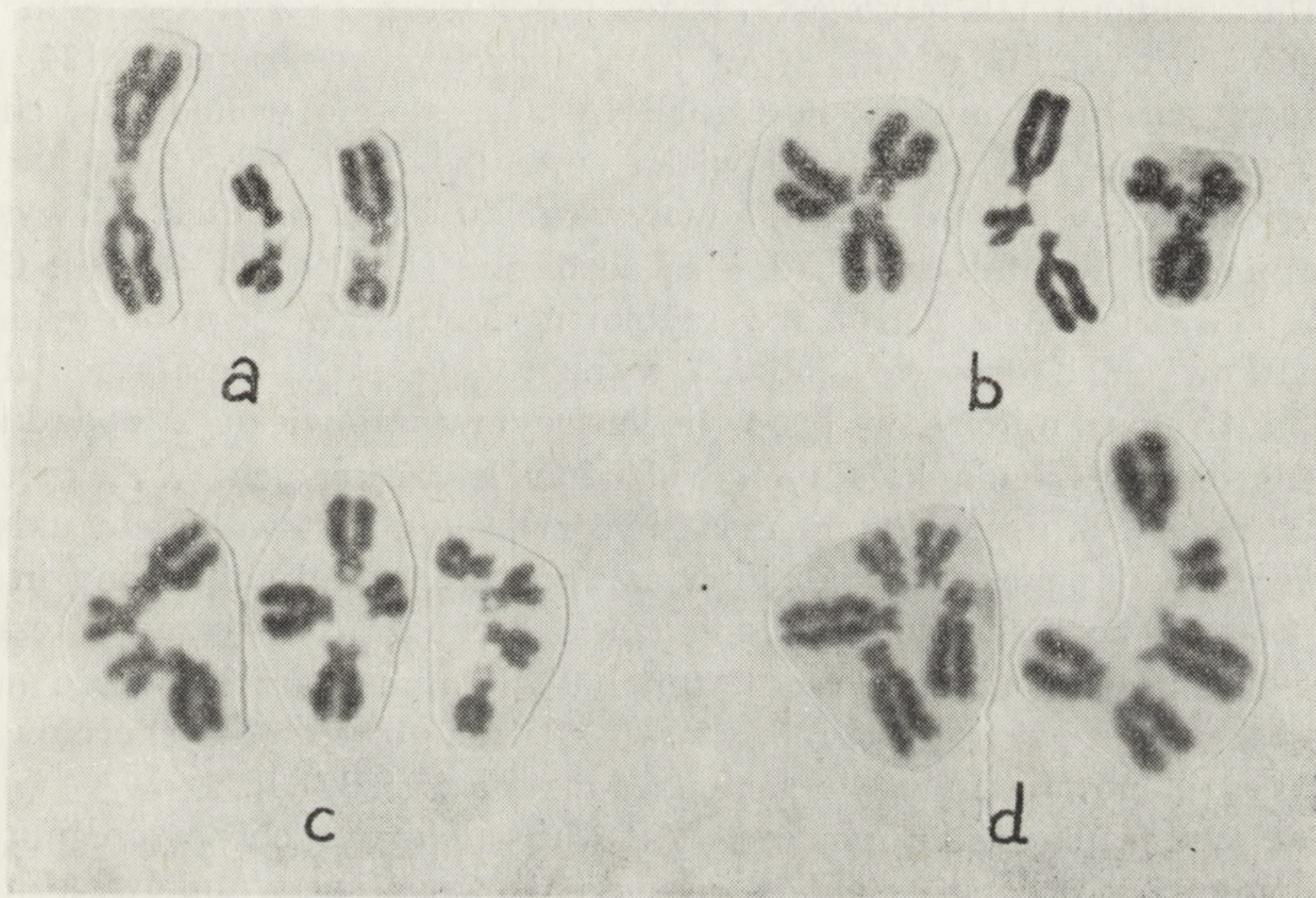
stanowiące matrycę dla transkrypcji prekursorów rybosomowego RNA, a w następstwie dojrzewania funkcjonalnych podjednostek rybosomowych. Obszary te zapewniają więc wytwarzanie rybosomów, które — jak wiadomo — są związane ściśle z procesem biosyntezy białka w komórce. Dlatego też wiele badań poświęcono ostatnio ich strukturze i funkcji.

Pierwsze obserwacje cytologiczne, które wydawały się wskazywać, że tylko pewne obszary niektórych par chromosomów biorą udział w tworzeniu jąderek, były przedstawione przez Heitza [25, 26]. Obszary te zostały później nazwane przez McClintock specyficznymi regionami organizującymi jąderko [50]. Obecnie używa się powszechnie terminu „organizatory jąderkowe” (Nucleolus Organizer Regions — NOR).

Zastosowanie techniki hodowli komórkowej limfocytów krwi obwodowej człowieka pozwoliło na pośrednie określenie, które chromosomy biorą udział w powstawaniu jąderek. W tym zakresie podstawowe są prace Ferguson-Smitha i Handmakera, którzy na podstawie obserwacji metafaz uzyskanych z hodowli wysunęli przypuszczenie, że w tworzeniu jąderek w komórce człowieka biorą udział chromosomy akrocentryczne grup D i G [14, 15]. Autorzy ci zwrócili uwagę na asocjacje satelitarne (AS), polegające na wzajemnym kontakcie chromosomów akrocentrycznych za pośrednictwem krótkich ramion, zawierających przewężenia wtórne lub za pośrednictwem satelitów. Według autorów, NOR znajdują się w przewężeniach wtórnych, które umiejscowione są w jąderku podczas interfazy. W profazie jąderko staje się mniejsze i w końcu zanika. W metafazie natomiast widoczne są AS, jako pozostałość kontaktu chromosomów akrocentrycznych w miejscach NOR z jąderkiem. Liczba jąderek w jądrze komórkowym jest zazwyczaj mniejsza niż liczba NOR na skutek fuzji dwóch lub więcej jąderek. Autorzy sugerują, że AS są wynikiem takiej fuzji i mogą wskazywać lokalizację aktywnych NOR w zasocjowanych chromosomach.

Doniesienia Ferguson-Smitha i Handmakera [14, 15] wzbudziły zainteresowanie tym problemem w wielu innych ośrodkach. W celu porównania i obiektywnej oceny wyników badań opracowano kryteria określające układ chromosomów w metafazie mitozy i mejozy jako asocjację. Według Nakagome [55], u człowieka chromosomy akrocentryczne tworzą AS wtedy, jeśli leżą w bezpośrednim sąsiedztwie i równocześnie zwrócone są do siebie krótkimi ramionami, a odległość między chromosomami nie przekracza szerokości jednej chromatydy. Według innych autorów chromosomy akrocentryczne człowieka uważa się za zasocjowane, jeśli odległość między centromerami tych chromosomów nie jest większa niż długie ramię największego chromosomu z grupy G [78] lub szerokość chromosomu [2]. Odległość ta może być większa, gdy chromosomy połączone są dobrze widocznym łącznikiem.

W zależności od liczby oraz składu występują różne typy AS. Przykładowo u człowieka, który posiada 10 chromosomów akrocentrycznych, w skład AS może wchodzić od 2 do 10 chromosomów. Najczęściej spotyka się asocjacje 2-chromosomowe, rzadziej 3-4-chromosomowe, najrzadziej powyżej 5 chromosomów. AS może składać się wyłącznie z chromosomów z grupy D albo z G, bądź zarówno z chromosomów D, jak i G (rys. 1).



Ryc. 1. Typy asocjacji satelitarnych (AS) w karyotypie człowieka (materiały własne): a — AS złożona z 2 chromosomów: 2D, 2G, DG; b — AS złożona z 3 chromosomów: 3D, 2DG, 2GD; c — AS złożona z 4 chromosomów: 2D2G, 3DG, 4G; d — AS złożona z 5 chromosomów 3D2G, 4DG

Wprowadzenie metod prążkowych do badań cytogenetycznych pozwoliło na dokładne ustalenie częstości wchodzenia w AS chromosomów poszczególnych par. Zdaniem niektórych autorów udział ten jest przypadkowy [10, 55, 67], podczas gdy inni stwierdzają większą częstość występowania w asocjacjach chromosomów par 13 i 21 w porównaniu z pozostałymi chromosomami akrocentrycznymi [9, 11, 20, 39].

W badaniach AS zwraca się uwagę zarówno na obecność obydwu chromosomów homologicznych w tej samej AS, jak i na średnią częstość występowania AS w komórce oraz średnią liczbę chromosomów w AS. Parametry te są różne u poszczególnych osobników, a podstawą tego zróżnicowania jest szeroki polimorfizm zdolności asocjowania dla każdego chromosomu zawierającego NOR. W inny sposób oceniają AS Yip

i Fox [81], którzy wprowadzają pojęcie względnej częstości AS, określającej udział każdej pary chromosomów akrocentrycznych w AS w stosunku do wszystkich zasocjowanych chromosomów. Zdaniem tych autorów, cecha ta nie zależy od wieku, lecz jest różna u poszczególnych osobników i dziedziczy się w obrębie rodzin. Już wcześniej Phillips [58] stwierdziła, że chromosomy akrocentryczne z wydłużonymi przewężeniami wtórnymi oraz z dużymi satelitami znacznie częściej uczestniczyły w AS u osobników z kolejnych pokoleń badanych przez nią rodzin.

Udowodniono także wzrost częstości AS wraz ze zwiększaniem się długości przewężeń wtórnych w asocjujących chromosomach [24, 62, 79] oraz zależność między ilością rDNA a częstością wchodzenia chromosomów akrocentrycznych człowieka w AS [54, 76].

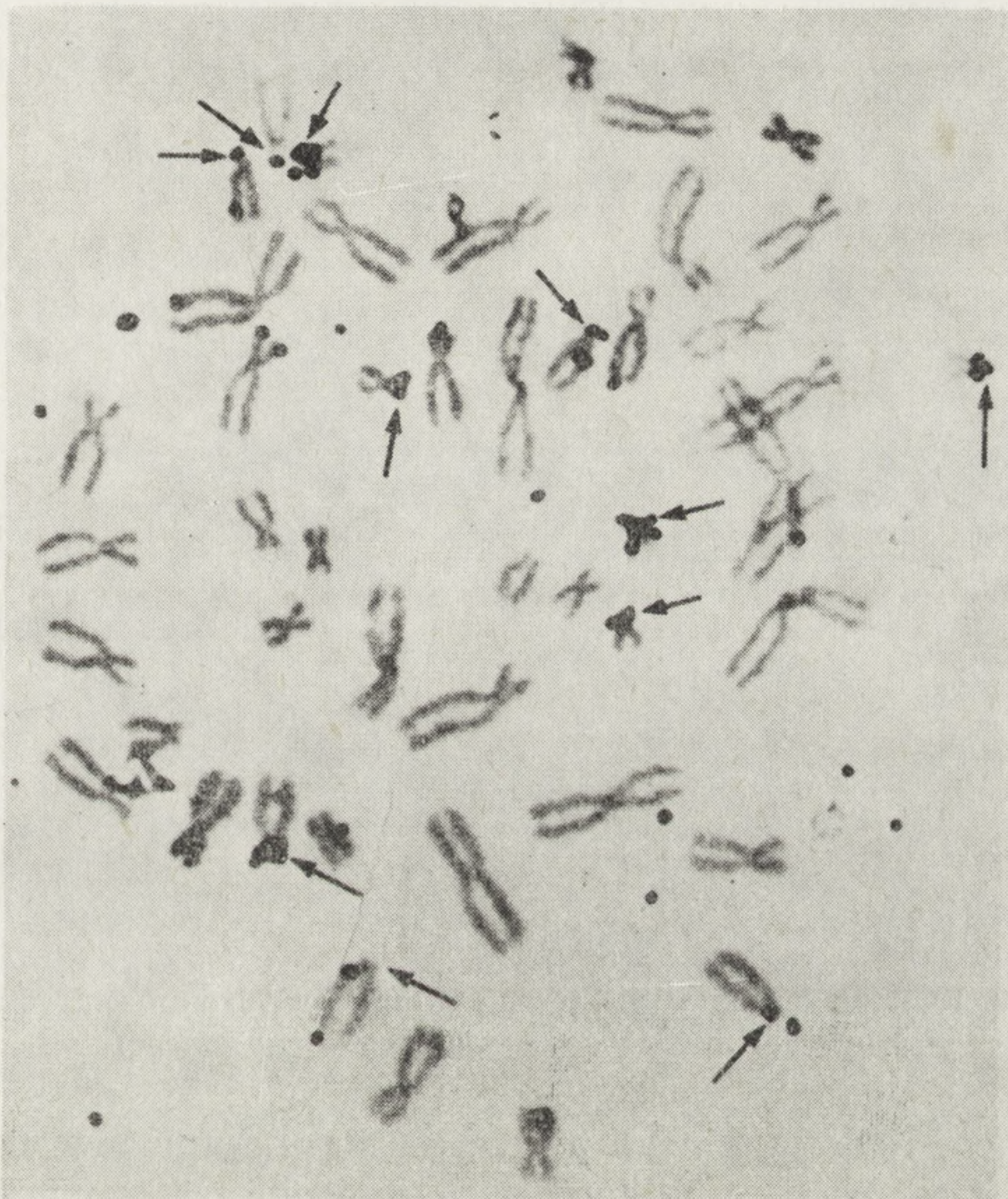
Wielokrotnie badano również wpływ wieku i płci na częstość występowania AS. Wyniki tych badań są rozbieżne [11, 19, 20, 48, 75]. Częstość AS zmienia się ponadto w szybko następujących po sobie cyklach komórkowych. Zaobserwowano ich wyraźny spadek w metafazach drugiej i trzeciej mitozy w hodowli limfocytów człowieka z dodatkiem BUDR dla określenia kolejnych podziałów komórkowych. Wysoka częstość AS w cyklu pierwszym może być związana z utrwalaniem układu chromosomów podczas długiej interfazy poprzedzającej pobudzony *in vitro* podział komórkowy. Następne cykle zachodzą zazwyczaj w czasie zbyt krótkim dla procesu reasocjacji [68]. Istotne znaczenie może mieć zwiększająca się liczba jąder, która — jak się okazuje — skorelowana jest z występowaniem AS w następnej metafazie [68, 80].

W rozważaniach nad częstością AS i udziałem w nich poszczególnych chromosomów nie można pominąć znaczenia wpływu czynników, którym komórki podlegają w czasie hodowli i sporządzania preparatów, jak np. czas hodowli, temperatura, płyn hipotoniczny itd.

Jak już wspomniano, występowanie AS i identyfikacja chromosomów wchodzących w ich skład pozwoliły jedynie pośrednio określić, które chromosomy zawierają obszary NOR i biorą tym samym udział w organizacji jąder. Dopiero zastosowanie techniki hybrydyzacji radioaktywnego rRNA z wyekstrahowanym DNA chromosomalnym dostarczyło dowodów na istnienie bezpośredniego związku obszarów NOR z powstaniem jąder. Pierwsze takie prace przeprowadzono u *Drosophila melanogaster* [60] i *Xenopus laevis* [74]. Badania te pozwoliły uchwycić zależność między liczbą jąder a liczbą NOR.

Następny etap badań stanowiło wprowadzenie techniki hybrydyzacji RNA-DNA *in situ* w połączeniu z technikami autoradiograficznymi i cytologicznymi (ryc. 2). Metody te umożliwiły dokładne określenie lokalizacji cistronów rDNA w genomie wielu zwierząt, roślin a także człowieka [13, 18, 27, 28, 45].

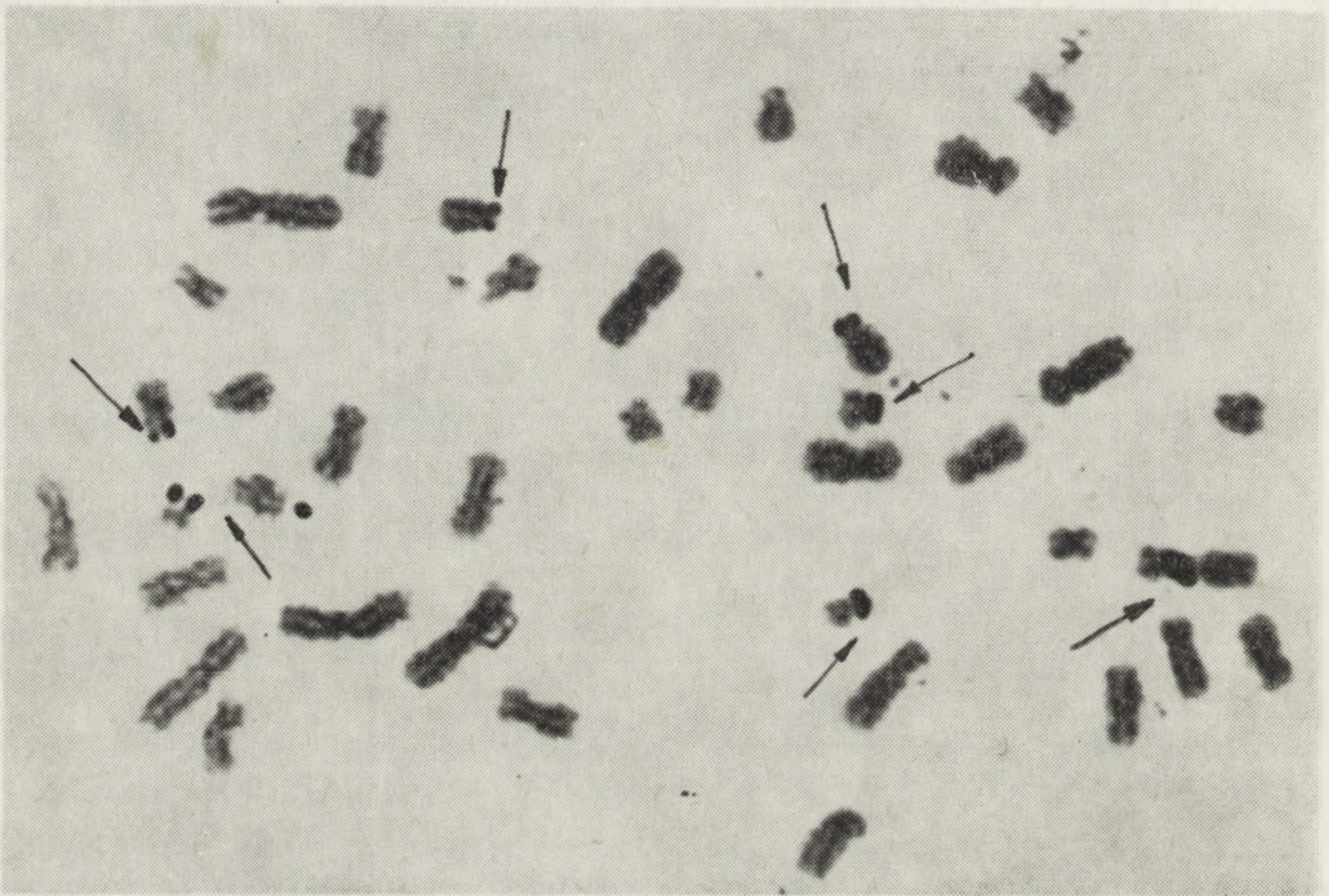
Obszary NOR zawierają cistrony kodujące syntezę 18S i 28S rRNA. W tym samym kompleksie DNA znajdują się cistrony kodujące syntezę 5,8S rRNA u człowieka, myszy [30], chomika chińskiego [1] czy u fasoli [12]. U większości badanych organizmów cistrony 5S rRNA zlokalizowane są poza obszarem NOR.



Ryc. 2. NOR wykazane metodami hybrydyzacji H^3 rRNA/DNA i autoradiografii w karyotypie człowieka zawierającym dodatkowy chromosom 21 (według [13])

Zastosowanie metod hybrydyzacji RNA-DNA umożliwiło ponadto określenie liczby cistronów rDNA. U roślin okrytozalążkowych liczba ta w komórkach diploidalnych wynosi przykładowo: u słonecznika (*Helianthus tuberosus*) — 520, u dyni (*Cucurbita pepo*) — 9800, u hiacynta (*Hyacinthus orientalis*) — 16 800. W genomie zwierząt i człowieka liczba cistronów rDNA jest dużo mniejsza. W diploidalnych komórkach żaby szponiastej (*Xenopus laevis*) stanowi ona 900-1600, muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) — 200 (cyt. za Olszewską [56].) U człowieka liczbę

tę oceniono na 100-420 [6, 43]. Należy dodać, że według sugestii Bernsa i Chenga [4], obszar zajęty przez NOR jest zwykle większy od obszaru zajmowanego przez rDNA, bowiem odcinki chromosomów akrocentrycznych człowieka, sąsiadujące bezpośrednio z przewężeniami wtórnymi, zawierają prawdopodobnie geny regulatory dla cistronów rDNA, współdziałające w regulacji ich ekspresji.

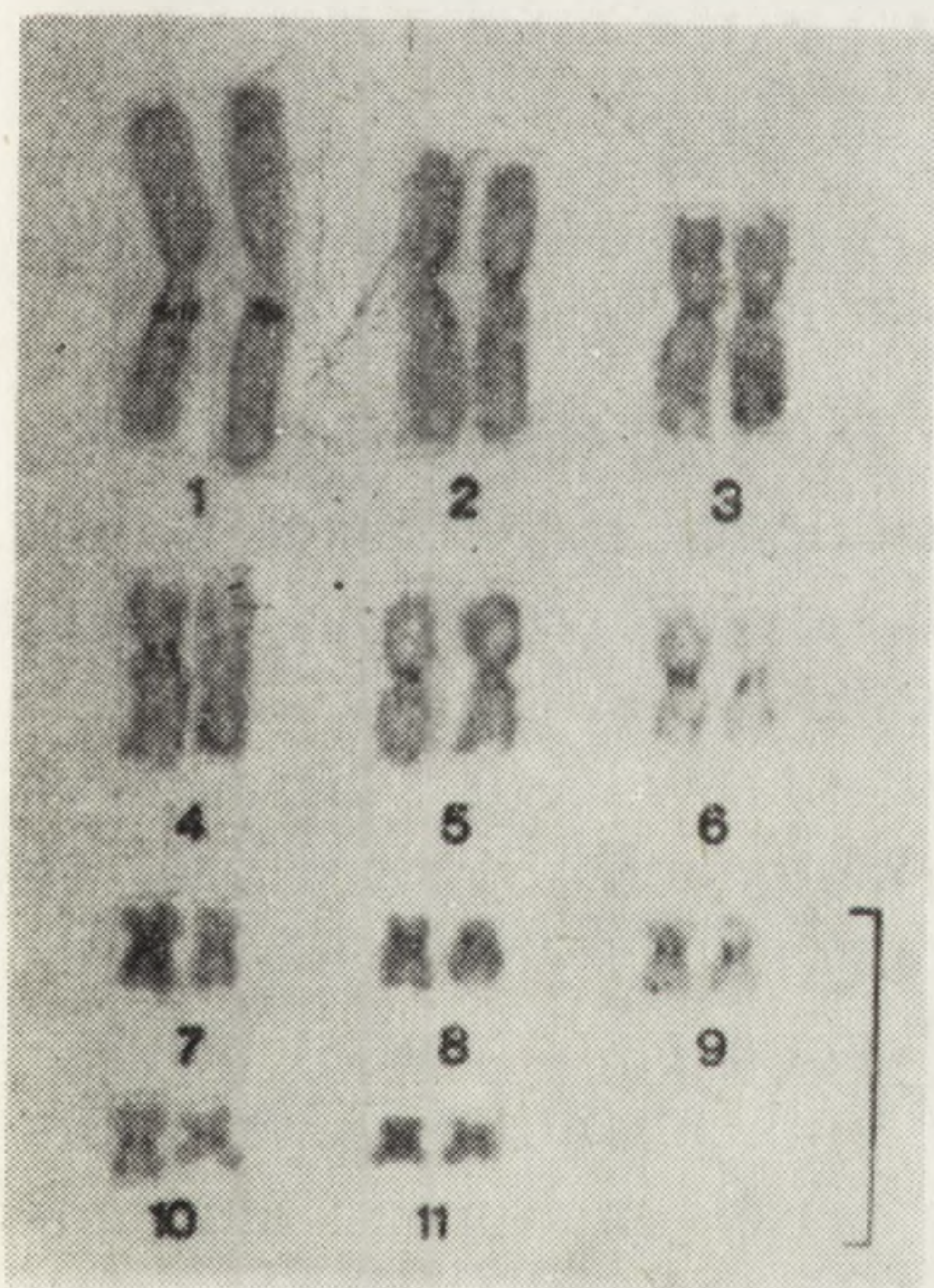


Ryc. 3. NOR wykazane w niektórych chromosomach akrocentrycznych człowieka metodą srebrzenia (materiały własne)

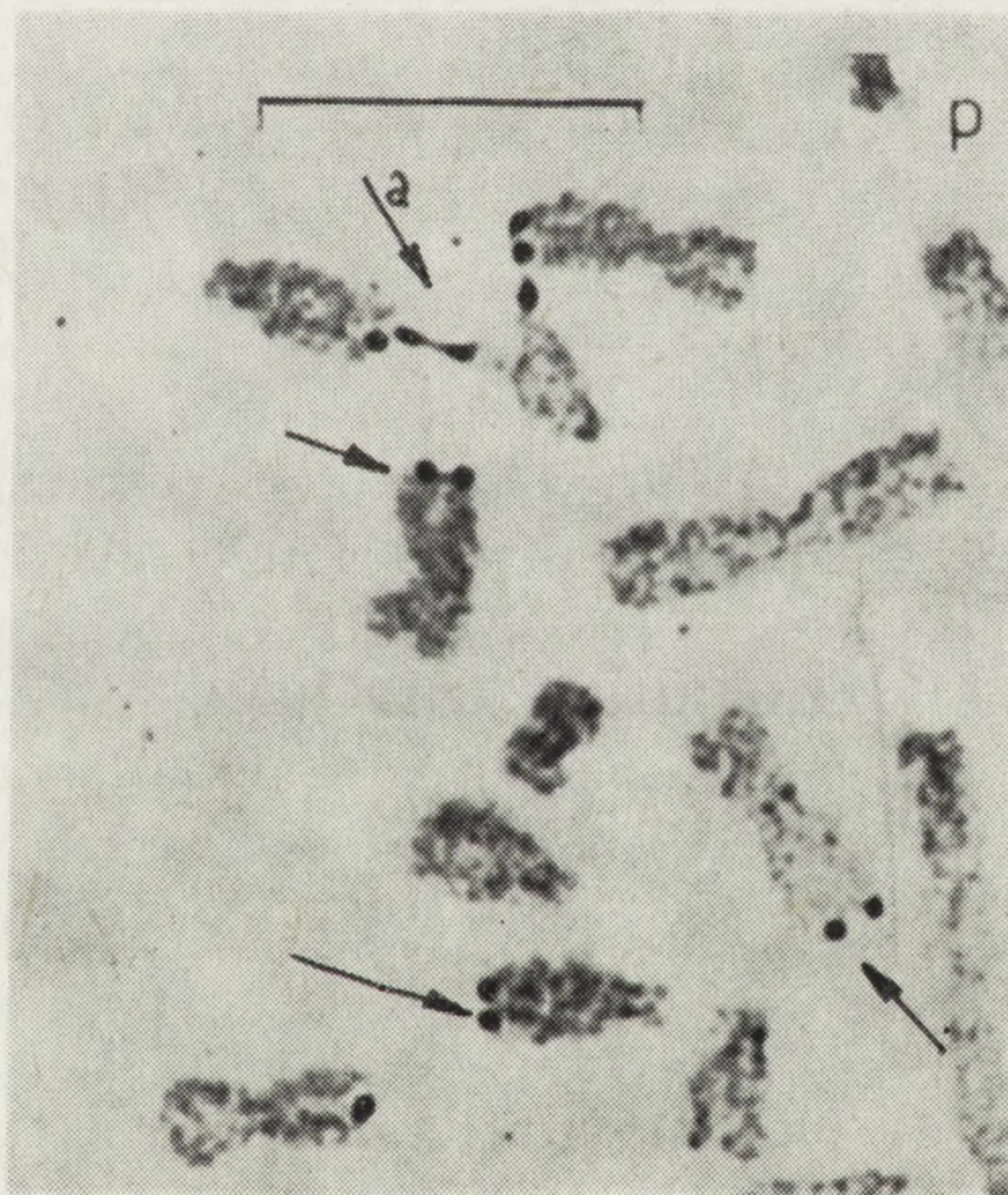
Lokalizacja NOR jest różna u poszczególnych gatunków. Obszary te występują w odcinkach centromerowych, w odcinkach terminalnych lub w przewężeniach wtórnych niektórych par chromosomów. U człowieka mieszczą się w przewężeniach wtórnych krótkich ramion chromosomów akrocentrycznych par 13, 14, 15, 21, 22 [13, 27]. U małp człekokształtnych położenie tych obszarów okazało się różne u poszczególnych gatunków. U szympansa (*Pan troglodytes*) NOR występują w przewężeniach wtórnych chromosomów akrocentrycznych, które odpowiadają parom 13, 14, 18, 21 i 22 u człowieka. U goryla (*Gorilla gorilla*) geny dla rRNA znajdują się w przewężeniach wtórnych dwóch par małych chromosomów akrocentrycznych, odpowiadających parom 21 i 22 u człowieka, oraz w części terminalnej pary 1. Duże chromosomy akrocentryczne goryla, podobne pod względem układu prążków do ich odpowiedników u człowieka, nie zawierają NOR [70]. Orangutan (*Pongo pygmaeus*) ma

w swoim kariotypie 10 par chromosomów akrocentrycznych, z których 9, tj. pary 11, 12-17, 22 i 23, zawiera NOR w przewężeniach wtórnych [31]. Gibbon (*Hylobates lar*), w przeciwieństwie do innych małp człekokształtnych, ma obszary NOR w obrębie przewężeń wtórnych tylko jednej, 15 pary chromosomów [70].

Obszary NOR w odcinkach przycentromerowych występują przykładowo u ropuchy (*Bufo fowleri*) w 1 parze chromosomów [63] (ryc. 4), u myszy (*Mus musculus*) w parach 12, 15, 16, 18 i 19 [29], a u nornika (*Microtus agrestis*) w parze 4 lub 5 [23]. Z kolei lokalizację genów dla rRNA w odcinkach terminalnych stwierdzono u chomika chińskiego (*Cricetulus griseus*) w parach 4-6, 9 i 10 [23] (ryc. 5), u kota domowego (*Felis catus*) w chromosomach E₁ i E₃ [57] oraz u owcy domowej (*Ovis aries*) w parach 1-4 i 25 [32]. Przykładów takich można podać wiele nie tylko wśród ssaków, ale także ryb [16], płazów [3], ptaków [17] i wielu roślin [17, 45].



Ryc. 4. Przycentromerowa lokalizacja NOR w 1 parze chromosomów ropuchy (*Bufo fowleri*) (według [63])



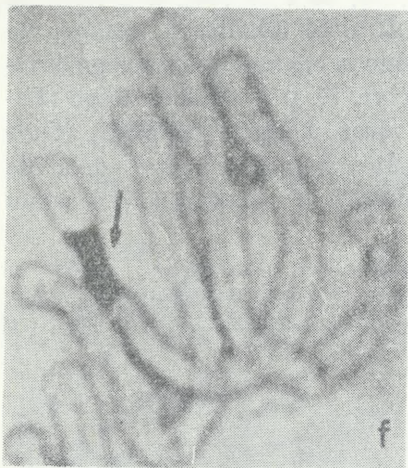
Ryc. 5. Terminalna lokalizacja NOR w chromosomach chomika chińskiego (*Cricetulus griseus*) (według [23]); a — terminalna AS

Niemal równolegle z zastosowaniem technik hybrydyzacji i autoradiografii wprowadzono w badaniach cytogenetycznych dwie proste metody barwienia obszarów NOR: prążki N oraz wysrebrzanie.

Mechanizm powstawania prążków N polega na usunięciu kwasów nukleinowych oraz histonów z chromosomów za pomocą podgrzanego kwasu

trójchlorooctowego [49] lub kwaśnego NaH_2PO_4 [17]. Zdaniem większości autorów, prążki N odpowiadają regionom NOR (ryc. 6), jednakże niektóre badania ujawniają brak tych prążków w chromosomach jąderkotwórczych lub ich występowanie w innych chromosomach [22, 59].

Bardziej popularną metodą okazało się wysrebrzenie obszarów jąderkotwórczych przy użyciu wodnego i amoniakalnego roztworu AgNO_3 [5, 36].



Ryc. 6. NOR wykazane metodą prążków N w jednym z chromosomów u bobu (*Vicia faba*) (według [17])

W wielu doświadczeniach wykazano, że wyniki srebrzenia dokładnie odpowiadają lokalizacji genów dla rRNA, ustalonej przy zastosowaniu hybrydyzacji [23, 31]. Na tej podstawie uznano srebrzenie za metodę specyficzną ujawniającą NOR.

Przeprowadzono liczne histochemiczne badania w celu scharakteryzowania substancji wiążącej srebro w tych metodach. Stwierdzono, że RNA-aza, DNA-aza, kwas trójchlorooctowy czy kwas solny nie eliminują reakcji wysrebrzenia się NOR, uniemożliwiają ją natomiast trypsyna lub pronaza [65]. Opierając się na tych wynikach autorzy wnioskują, że substancja wysrebrzająca się nie jest częścią materiału chromosomalnego, lecz kwaśnym białkiem gromadzącym się wokół komponenty chromosomalnej. Białka te określono jako białka jąderkowe C23 i B23 [44] lub jako jedno białko Ag-NOR [37], lub też jako podjednostkę polimerazy I [77]. Nie zostały one jeszcze scharakteryzowane pod względem biochemicznym oraz immunologicznym.

Obserwacje przeprowadzone za pomocą mikroskopu elektronowego wykazały, że miejscem specyficznego wysrebrzającym się w jąderku podczas interfazy są centra fibrylarne, w których przypuszczalnie gromadzą się białka jąderkowe [34, 66, 73]. Równoczesne zastosowanie metody Feulgena oraz srebrzenia pozwoliły dokładnie zlokalizować wysreb-

rzające się białka Ag-NOR w odniesieniu do włókien chromatynowych. Cienkie włókna chromatynowe o grubości 2-3 μm rozprzestrzeniają się między złogami srebra, łącząc się jednak z nimi częściowo. Stąd wniosek, że przynajmniej część białek Ag-NOR pozostaje w ciągłym kontakcie z materiałem chromosomalnym [34]. W nowszych badaniach stwierdzono, że w miejscach kontaktu ze złogami srebra włókna chromatynowe są całkowicie rozwinięte i nie mają budowy nukleosomowej. Przypuszcza się, że to właśnie białka Ag-NOR utrzymują rybosomalne geny w rozwiniętej konfiguracji, umożliwiając w ten sposób intensywną transkrypcję. Mogą więc one pełnić funkcję strukturalną, a obserwacje ich wysrebrzeń pozwalają na określenie „aktywne” bądź „nieaktywne” obszary NOR [35].

Ilość złogów srebra w interfazie jest zwykle dużo większa niż podczas mitozy. Badania zsynchronizowanych komórek HeLa podczas cyklu komórkowego wykazały, że ich ilość wzrasta w czasie fazy G_1 i utrzymuje się do fazy G_2 [38]. W późnej fazie G_2 następuje dezorganizacja materiału srebrochłonnego. Pod koniec profazy, kiedy aktywność NOR ustaje, materiał ten prawdopodobnie jest częściowo transportowany do cytoplazmy. W metafazie i anafazie w miejscach NOR pozostają jedynie nieliczne srebrne kropki, wskazujące, według Millera [53], na związek z procesem transkrypcji w czasie interfazy poprzedzającej podział. Dopiero w późnej telofazie, wraz z aktywacją NOR, ilość materiału srebrochłonnego znowu wzrasta i pojawiają się jąderka. Również podczas podziału mejotycznego materiał srebrochłonny zachowuje się do pachytenu. Nie zaobserwowano go natomiast nawet w postaci nielicznych kropek srebra w I i II metafazie [63-65].

W mikroskopie elektronowym większość chromatyny metafazowej widoczna jest jako chromatyna nieaktywna, złożona z powtarzających się kulistych jednostek — nukleosomów o średnicy około 11 μm . Jedynie w obszarach NOR włókna chromatynowe zachowują podczas metafazy całkowicie rozwiniętą, nienukleosomową konfigurację, charakterystyczną dla chromatyny aktywnej, mimo braku syntezy rRNA. Można zatem przypuszczać, że taka struktura włókien nie zawsze jest konsekwencją aktywności transkrypcyjnej. W przypadku genów rybosomalnych, zlokalizowanych w NOR, mogłoby to stanowić cechę trwałą. Przypuszczenie takie wysunęli Hernandez-Verdun i Derenzini [35] sugerując ponadto, że zachowanie rozciągniętej struktury włókien chromatynowych w NOR i obecność wysrebrzających się białek Ag-NOR podczas podziału komórkowego jest wyrazem przygotowania się genów rDNA do transkrypcji, która zachodzić będzie po zakończeniu mitozy w następnej interfazie.

Liczne badania miały na celu udowodnienie przydatności metody sreb-

rowej jako wskaźnika aktywności transkrypcyjnej obszarów NOR. Najbardziej przekonujące wydawały się doświadczenia, w których hamowano proces transkrypcji i analizowano efekt srebrzenia [53]. Całkowite zahamowanie ekspresji genów ludzkiego rRNA uzyskano w badaniach hybrydów komórek ludzkich, zawierających niepełny garnitur chromosomalny, oraz mysich, zawierających zwykle wszystkie chromosomy. W takich hybrydach istnieje tendencja do częściowej eliminacji chromosomów ludzkich, co przypuszczalnie powoduje inaktywację ludzkiego rDNA [53]. Miller i wsp. [53] stwierdzili brak wysrebrzeń ludzkich obszarów NOR, podczas gdy mysie NOR dawały pozytywną reakcję z AgNO_3 . Marshall i wsp. [47], badając 25 linii hybrydowych, również nie zaobserwowali w żadnej z nich ludzkiego 28S rRNA. Wysrebrzanie przedwcześnie skondensowanych chromosomów (PCC) pochodzących z hodowli o różnej aktywności genów rRNA także dawało różne wyniki. W hodowlach pochodzących z niestymulowanych limfocytów, syntetyzujących małe ilości rRNA, wysrebrzanie nie występowało, natomiast w hodowlach z hamowanym kontaktowo wzrostem fibroblastów i zredukowaną syntezą rRNA około połowa NOR nie ulegała wysrebrzaniu. W hodowlach intensywnie wzrastających większość NOR reagowała ze srebrem pozytywnie [61]. Podobnie, zastosowanie aktynomycyny D, która w niskich stężeniach hamuje syntezę rRNA, powodowało fragmentację jąder i całkowity brak lub niewielką liczbę wysrebrzeń w czasie fazy G_1 , podczas gdy w kontrolnych preparatach występował wyraźny wzrost ilości złogów srebra wraz ze wzrostem syntezy rRNA [38]. Wyniki tych doświadczeń wskazują na wyraźną zależność między transkrypcyjną aktywnością genów rRNA a pozytywną reakcją wysrebrzania.

Istniały hipotezy zakładające, iż wysrebrzenie niektórych odcinków chromosomów metafazowych określane jest przez ilość zawartego w nich rDNA, która jest różna w poszczególnych obszarach NOR [13]. Badania Warburtona i Hendersona [76] nie potwierdziły istnienia takiej korelacji, co pozwala sądzić, iż zróżnicowanie wysrebrzonych obszarów w płytkach metafazowych zależne jest nie od ilości rDNA, lecz od jego aktywności transkrypcyjnej.

Na tej podstawie przyjmuje się na ogół, że wysrebrzają się tylko te odcinki NOR, w których transkrypcja zachodziła podczas poprzedzającej podział interfazy [53]. Jak już wspomniano, najnowsze badania [35] wnoszą jednak do tej koncepcji pewne zmiany sugerujące, że w chromosomach metafazowych wysrebrzają się te odcinki NOR, w których transkrypcja odbędzie się w następnym cyklu komórkowym.

Nie można powinać wątpliwości niektórym autorów dotyczących srebrzenia jako metody odzwierciedlającej aktywność NOR. Wynikają one zazwyczaj ze spostrzeżeń, że srebrzenie może być istotnym wskaźnikiem

aktywności NOR tylko w przypadku intensywnej syntezy rRNA, natomiast wydaje się nieadekwatne, jeśli obszary te nie są aktywne. Przykładowo, Verschaeve i wsp. [72] po zahamowaniu syntezy rRNA za pomocą aktynomycyny D nie stwierdzili różnic w ilości wysrebrzeń w płytach metafazalnych, w stosunku do materiału kontrolnego. Schmiady zaś i wsp. [61] uważają, że metodą tą nie uzyskuje się właściwych wyników przy niskim poziomie syntezy rRNA.

Oceniając zróżnicowane wyniki aktywności NOR przy zastosowaniu srebrzenia, należy wziąć również pod uwagę nie tylko uwarunkowania biologiczne, ale także czynniki techniczne, jak np. czas inkubacji z AgNO_3 , różny stopień penetracji jonów srebra czy też indywidualne różnice w ocenie osadu srebra. Stosując więc metodę wysrebrzania napotyka się pewne trudności, zwłaszcza w badaniach ilościowych. Niekiedy reakcja w pełni pozytywna zachodzi w preparacie niejednolicie, tj. w małych oddzielnych polach. Może to wynikać z mniejszej ilości srebra w polach negatywnych; wiadomo już bowiem, że do ujawnienia się srebra w mikroskopie świetlnym konieczna jest jego pewna koncentracja. Obserwując preparaty w mikroskopie elektronowym stwierdzono występowanie małych osadów, niewidocznych w mikroskopie świetlnym [65].

Zgodnie z omawianymi zjawiskami nie wszystkie NOR wysrebrzają się jednocześnie. Liczba wysrebrzonych, NOR w chromosomach metafazowych człowieka waha się w granicach 5-10, przy czym stwierdzono wyraźne różnice indywidualne [5, 36, 51], związane z miejscem zamieszkania [51, 52], a także rasowe [71].

Ponadto wśród metafaz tego samego osobnika istnieje międzykomórkowe zróżnicowanie ekspresji NOR, które w metodzie srebrzej dotyczy zarówno ilości, jak i wielkości oraz intensywności zabarwienia osadów srebra. U tego samego osobnika chromosomy homologiczne w jednej lub w kilku parach mogą wysrebrzać się różnie. Ciekawe jest zagadnienie, czy zawsze ten sam chromosom w parze chromosomów homologicznych jest bardziej aktywny. Szczegółowa analiza wykazała, że w polimorficznych parach, różniących się długością przewężenia wtórnego, chromosom z dłuższym przewężeniem wtórnym zawsze wybarwiał się silniej, podczas gdy jego homolog miał wysrebrzenie śladowe, bądź nie wysrebrzał się [41]. Obserwowane różnice morfologii osadów srebra są trudne do interpretacji. W komórkach zróżnicowanych widoczne jest zwykle jedno duże jąderko wysrebrzające się w postaci zbitego złożu srebra, podczas gdy w komórkach niezróżnicowanych jest kilka mniejszych wysrebrzających się jąderek. W późnej profazie obserwuje się duże, pojedyncze osady, natomiast w metafazie każda chromatyda z reguły ma swój własny osad srebra. Typowy dla chromosomu metafazowego jest więc podwójny osad srebra, choć czasem może być pojedynczy

lub potrójny. Przypuszcza się, że różnice te mogą być konsekwencją niejednakowych ilości bądź aktywności rDNA, albo obu tych czynników łącznie [7, 40]. Ponadto prawie zawsze istnieją różnice dotyczące wielkości poszczególnych złogów srebra, określanych najczęściej według subiektywnych norm obserwatorów: mały, średni, duży i bardzo duży (ryc. 7). Mimo tych różnic nie można wykluczyć możliwości uznania wielkości osadów srebra za cechę charakterystyczną chromosomu.



Ryc. 7. Wielkość złogów srebrowych w NOR u człowieka (według [46]): 4 — bardzo duże wysrebrzenie, 3 — duże wysrebrzenie, 2 — średnie wysrebrzenie, 1 — małe wysrebrzenie, 0 — brak wysrebrzenia

W badaniach rodzinnych wykazano, że stopień wysrebrzenia NOR jest charakterystyczną, dziedziczną cechą chromosomu, która może występować w kolejnych pokoleniach, zgodnie z prawami Mendla [40, 46, 51]. Biorąc pod uwagę znaczny polimorfizm NOR, należałoby przypuszczać, że jest to cecha dziedziczna, która może być modyfikowana przez czynniki środowiskowe [40].

Wyraźny polimorfizm międzykomórkowy, wewnątrzpopulacyjny, jak również międzyrasowy, dotyczący liczby, wielkości czy ujawniania się NOR, zaobserwowano nie tylko u człowieka, ale również u wielu zwierząt i roślin. Znaczne różnice w liczbie i wielkości NOR stwierdzono np. między odmianami jęczmienia (*Hordeum vulgare*) [42]. Niektóre odmiany mają liczne obszary NOR niewielkich wymiarów, podczas gdy u większości odmian występują one zazwyczaj jako duże obszary w 6 i 7 parze chromosomów. Podobne różnice między rasami występują u świni domowej (*Sus scrofa domestica*). U osobników rasy yorshire obserwowano wysrebrzenia NOR wyłącznie w przewężeniach wtórnych chromosomów pary 10, podczas gdy jedna z ras duńskich ma wyraźne NOR w parach 7 i 10 [69]. U ryb należących do trzech różnych rodzin z rzędu *Gymnotiformes* zlokalizowano NOR w jednej, tej samej parze chromosomów. W tym przypadku polimorfizm dotyczy wielkości NOR ujawnionych metodą srebrową jako całkiem małe obszary lub wzrastające stopniowo do około sześciokrotnie większych [16].

Badano również zależność między wysrebrzaniem obszarów NOR a częstością występowania AS [8, 21, 54]. Okazało się, że jest ona wysoce znamienna, jakkolwiek obserwowano chromosomy, które nie wysrebrzały się, bądź zawierały małe osady srebra, mimo udziału w AS [33]. Warburton i Henderson [76] już wcześniej stwierdzili korelację między częstością AS a ilością rDNA w obszarach NOR chromosomów akrocentrycznych człowieka, biorących udział w AS. Sugerują oni, że ilość rDNA w NOR może być ważnym czynnikiem determinującym występowanie AS, a indywidualne różnice w ich częstości mogą być spowodowane niejednakową aktywnością. Jest to reguła, od której mogą zdarzyć się wyjątki; napotkano bowiem chromosomy o wysokiej zawartości NOR, które mimo to nie wchodziły w AS. Stąd można wnioskować, że zawartość rDNA nie jest jedynym czynnikiem warunkującym udział w AS.

Z dotychczasowych badań wynika, że zróżnicowanie ekspresji obszarów NOR oraz częstości występowania i składu AS istnieje nie tylko między gatunkami czy podgatunkami, ale również między osobnikami określonej populacji oraz między komórkami tego samego osobnika. Przyczyny warunkujące zróżnicowanie w tak szerokim zakresie nie są znane. Wydaje się, że tak duża zmienność musi się wiązać z funkcjonalną aktywnością obszarów NOR pozostających stale pod wpływem czynników środowiskowych. Wynikają stąd trudności w dokładnym określeniu ekspresji obszarów NOR. Wskazane byłoby opracowanie ujednoczonej klasyfikacji NOR z wykorzystaniem metody srebrowej czy prążków N w celu zastosowania jej w szerokich, porównawczych badaniach populacyjnych, które umożliwiłyby lepsze poznanie zjawiska polimorfizmu NOR oraz jego pochodzenia i roli.

Serdecznie dziękuję Pani doc. dr hab. Danucie Dziekanowskiej za cenne uwagi i pomoc w przygotowaniu pracy.

LITERATURA

- [1] AMALDI F., BUONGIORNO-NARDELLI M., Molecular, hybridization of chinese hamster 5S, 4S and "pulse-labelled" RNA in cytological preparations, *Exp. Cell Res.*, **65**: 329-334, 1971.
- [2] ARDITO G., LAMBERT L., BROGGER A., Satellite associations of human acrocentric chromosomes identified by trypsin treatment at metaphase, *Ann. Hum. Genet.*, **41**: 455-462, 1978.
- [3] BARSACCHI-PILONE G., NARDI J., BATISTONI R., ANDRONICO F., BECCARI E., Chromosome location of the genes for 28S, 18S and 5S ribosomal RNA in *Triturus marmoratus* (*Amphibia Urodela*), *Chromosoma*, **49**: 135-154, 1974.

- [4] BERNS M. W., CHENG W. K., Are chromosome secondary constrictions nucleolar organizers?, *Exp. Cell Res.*, **69**: 185-188, 1971.
- [5] BLOOM S. E., GOODPASTURE C., An improved technique for selective silver staining of nucleolar regions in human chromosomes, *Hum. Genet.*, **34**: 199-206, 1976.
- [6] BROSS K., KRONE W., On the number of ribosomal genes in man, *Hum. Genet.*, **14**: 137-141, 1972.
- [7] BUYS C., OSINGA J., ANDERS G., — Age-dependent variability of ribosomal RNA-genes activity in man as determined from frequencies of silver staining nucleolus organizing regions on metaphase of lymphocytes and fibroblasts, *Mech. of Ageing and Devel.*, **11**: 55-75, 1979.
- [8] DE CAPOA A., FERRARO M., MENENDEZ F., MOSTACCI C., PELLICCIA F., ROCCHI A., Ag-staining of the nucleolus organizer (NO) and its relationship to satellite association, *Hum. Genet.*, **44**: 71-77, 1978.
- [9] COOKE P., Patterns of secondary association between the acrocentric chromosomes of man, *Chromosoma*, **36**: 221-240, 1972.
- [10] CUEVAS-SOSA A., Human chromosomology. Random association of chromosomes, *Genetika*, **41**: 626-634, 1970.
- [11] DAVISON E., ROBERTS D., CALLOW M., Satellite association in Down's syndrome, *Hum. Genet.*, **56**: 309-313, 1981.
- [12] DURANTE M., CIONINI P., AVANZI S., CREMONINI R., D'AMATO F., Cytological localization of the genes for the four classes of ribosomal RNA (25S, 18S, 5.8S and 5S) in polytene chromosomes of *Phascouls coccineus*, *Chromosoma*, **60**: 269-282, 1977.
- [13] EVANS H., BUCKLAND R., PARDUE M., Location of the genes coding for 18S and 28S ribosomal RNA in the human genome, *Chromosoma*, **48**: 405-426, 1974.
- [14] FERGUSON-SMITH M., HANDMAKER S., Observations on the satellited human chromosomes, *Lancet*, **1**: 638-640, 1961.
- [15] FERGUSON-SMITH M., HANDMAKER S., The association of satellited chromosomes with specific chromosomal regions in cultured human somatic cells, *Ann. Hum. Genet. Lond.*, **27**: 143-147, 1963.
- [16] FORESTI F., ALMEIDA TOLEDO L., TOLEDO S., Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes, *Cytogenet. Cell Genet.*, **31**: 137-144, 1981.
- [17] FUNAKI K., MATSUI S., SASAKI M., Location of nucleolar organizers in animal and plant chromosomes by means of improved N-banding technique, *Chromosoma*, **49**: 357-369, 1975.
- [18] GALL J., PARDUE M., Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **63**: 378-383, 1969.
- [19] GALPERIN H., Number of each type of acrocentric association and probability of its occurrence in human male and female metaphase cell, *Cytogenetics*, **8**: 439-446, 1969.
- [20] GALPERIN-LEMAITRE H., HENS L., KIRSCH-VOLDERS M., SUSANE C., Non-random association of trypsin-banded human acrocentric chromosomes, *Hum. Genet.*, **35**: 261-268, 1977.
- [21] GALPERIN-LEMAITRE H., HENS L., SELE B., Comparison of acrocentric associations in male and female cells. Relationship to the active nucleolar organizers, *Hum. Genet.*, **54**: 349-353, 1980.
- [22] GERLACH W., N-banded karyotypes of wheat species, *Chromosoma*, **62**: 49-56, 1977.

- [23] GOODPASTURE C., BLOOM S., Visualization of NORs in mammalian chromosomes using silver staining, *Chromosoma*, **53**: 37-50, 1975.
- [24] HAYATA J., OSHIMURA M., SANDBERG A., N-band polymorphism of human acrocentric chromosomes and its relevances to satellite association, *Hum. Genet.*, **36**: 55-61, 1977.
- [25] HEITZ E., Die Ursache der gesetzmässigen Zahl, Lage, Form und grosse pflanzlicher Nukleolen, *Planta*, **12**: 775, 1931a.
- [26] HEITZ E., Nukleolon und Chromosomen in der Gattung *Vicia*, *Planta*, **15**: 495, 1931b.
- [27] HENDERSON A., WARBURTON D., ATWOOD K., Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **69**: 3394-3398, 1972.
- [28] HENDERSON A., WARBURTON D., ATWOOD K., Location of r-DNA in the chimpanzee (*Pan troglodytes*) chromosome complement, *Chromosoma*, **46**: 435-438, 1974.
- [29] HENDERSON A., EICHER E., YU M., ATWOOD K., Variation in ribosomal RNA gene number in mouse chromosomes, *Cytogenet. Cell Genet.*, **17**: 307-316, 1976.
- [30] HENDERSON A., YU M., MILCAREK C., On the chromosomal location of 5,8S DNA in people and mice, *Cytogenet. Cell Genet.* **23**: 201-207, 1979.
- [31] HENDERSON A., WARBURTON D., MEGRAW-RIPLEY S., ATWOOD K., The chromosomal location of rDNA in Sumatran orangutan, *Pongo pygmaeus albei*, *Cytogenet. Cell Genet.*, **3**: 213-216, 1979.
- [32] HENDERSON A., BRUÈRE A., Inheritance of Ag-stainability of the nucleolus organizer regions in domestic sheep *Ovis aries*, *Cytogenet. Cell Genet.*, **26**: 1-6, 1980.
- [33] HENS L., KIRSCH-VOLDERS M., ARRIGHI F., SUSANNE C., Relationship between measured chromosome distribution parameters and Ag-staining of the nucleolus organizer regions, *Hum. Genet.*, **53**: 363-370, 1980.
- [34] HERNANDEZ-VERDUN D., DERENZINI M., BOUTEILLE M., The morphological relationship in electron microscopy between NOR-silver proteins and intranucleolar chromatin, *Chromosoma*, **85**: 461-473, 1982.
- [35] HERNANDEZ-VERDUN D., DERENZINI M., Non-nucleosomal configuration of chromatin in nucleolar organizer regions of metaphase chromosomes in situ, *Eur. J. Cell Biol.*, **31**: 360-365, 1983.
- [36] HOWELL W., DENTON T., DIAMOND J., Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes, *Experientia*, **31**: 260-262, 1975.
- [37] HUBELL H., ROTHBLUM L., HSU T., Identification of a silver binding protein associated with the cytological silver staining of actively transcribing nucleolar regions, *Cell Biol. Internat. Reports*, **3**: 615-622, 1979.
- [38] HUBELL H., YUN-FAI LAU, BROWN L., HSU T., Cell cycle analysis and drug inhibition studies of silver staining in synchronous HeLa cells, *Exp. Cell Res.*, **129**: 139-147, 1980.
- [39] ING P., YU P., PALMER C., Variations in patterns of satellite associations, *Am. J. Hum. Genet.*, **25**: 34-38, 1973.
- [40] JOTTERAND-BELLOMO M., VAN MELLE G., Variability of nucleolar organizer activity in human lymphocytes via Ag-staining, *Hum. Genet.*, **59**: 141-147, 1981.
- [41] JOTTERAND-BELLOMO M., VAN MELLE G., Is it the same NOR that is more active in a pair of acrocentric with distinct Ag-staining?, *Hum. Genet.*, **59**: 185-187, 1981.

- [42] LINDE-LAURSEN J., Nucleolus organizer polymorphism in barley *Hordeum vulgare*, *Hereditas*, **100**: 33-43, 1984.
- [43] LONG E., DAWID I., Repeated genes in Eukaryotes, *Ann. Rev. Biochem.*, **49**: 727-764, 1980.
- [44] LISCHWE M., SMETANA K., OLSON M., BUSCH H., Protein C23 and B23 are the major nucleolar silver staining proteins, *Life Sciences*, **25**: 701-708, 1979.
- [45] MAGGINI F., BARSANTI P., MARAZIA T., Individual variation of the nucleolus organizer regions in *Allium cepa* and *A. sativum*, *Chromosoma*, **66**: 173-183, 1978.
- [46] MARKOVIC V., WORTON R., BERG J., Evidence for the inheritance of silver-stained nucleolus organizer regions, *Hum. Genet.*, **41**: 181-187, 1978.
- [47] MARSHALL C., HANDMAKER S., BRAMWELL M., Synthesis of ribosomal RNA in synkaryons and heterokaryons formed between human and rodent cells, *J. Cell Sci.* **17**: 307-325, 1975.
- [48] MATTEVI M., SALZANO F., Effect of sex, age and cultivation time on number of satellite and acrocentric associations in man, **29**: 265-270, 1975.
- [49] MATSUI S., SASAKI M., Differential staining of nucleolus organizers in mammalian chromosomes, *Nature*, **246**: 148-150, 1973.
- [50] MCCLINTOCK B., The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea mays*, *Z. Zellforsch.*, **21**: 294, 1934.
- [51] MIKELSAAR A., SCHMID M., KRONE W., SCHWARZACHER H., SCHNEDL W., Frequency of Ag-stained nucleolus organizer regions in acrocentric chromosomes of man, *Hum. Genet.*, **37**: 73-77, 1977.
- [52] MIKELSAAR A., ILUS T., Population polymorphism in silver staining of nucleolus organizers (NORs) in human acrocentric chromosomes, *Hum. Genet.*, **51**: 281-285, 1979.
- [53] MILLER D., DEV V., TANTRAVAHU R., MILLER O., Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human hybrid cells, *Exp. Cell Res.*, **101**: 235-243, 1976.
- [54] MILLER D., TANTRAVAHU R., DEV V., MILLER O., Frequency of satellite association of human chromosomes is correlated with amount of Ag-staining of the nucleolus organizer region, *Am. J. Hum. Genet.*, **29**: 490-502, 1977.
- [55] NAKAGOME Y., DNA replication studies of human D-group chromosomes in satellite associations, *Cytogenetics*, **8**: 296-303, 1969.
- [56] OLSZEWSKA M., Metody badania chromosomów. Praca zbiorowa. PWRiL 1981.
- [57] PEARSON M., SEABRIGHT M., MACLEAN N., Silver staining of nucleolar organizer regions in the domestic cat, *Felis catus*, *Cytogenet. Cell Genet.*, **24**: 245-247, 1979.
- [58] Phillips R., Inheritance of acrocentric association patterns, *Humangenetik*, **29**: 309-318, 1975.
- [59] PIMPINELLI S., SANTINI G., GATTI M., Characterization of *Drosophila* heterochromatin II C- and N-banding, *Chromosoma*, **57**: 377-386, 1976.
- [60] RITOSSA F., SPIEGELMAN G., Localization of DNA complementary to ribosomal RNA in the nucleolus organizer region of *Drosophila melanogaster*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **53**: 737-745, 1965.
- [61] SCHMIADY H., MUNKE M., SPERLING K., Ag-staining of nucleolus organizer regions on human prematurely condensed chromosomes from cells with different ribosomal RNA gene activity, *Exp. Cell Res.*, **121**: 425-428, 1979.
- [62] SCHMID M., KRONE W., VOGEL W., On the relationship between the fre-

- quency of association and the nucleolar constriction of individual of acrocentric chromosomes, *Hum. Genet.*, **23**: 267-277, 1974.
- [63] SCHMID M., Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*, *Chromosoma*, **66**: 361-388, 1978.
- [64] SCHMID M., HOFGARTNER F., ZENZES M., ENGEL W., Evidence for post-meiotic expression of ribosomal RNA genes during male gametogenesis, *Hum. Genet.*, **38**: 279-284, 1977.
- [65] SCHWARZACHER H., MIKELSAAR A., SCHNEDL W., The nature of Ag-staining of nucleolus organizer regions. Electron- and light-microscopic studies on human cells in interphase, mitosis and meiosis, *Cytogenet. Cell Genet.*, **20**: 24-39, 1978.
- [66] SCHWARZACHER H., WACHTLER F., Nucleolus organizer regions and nucleoli, *Hum. Genet.*, **63**: 89-99, 1983.
- [67] SHAW M., CRAIG A., RICCINTI F., Random association of human acrocentric chromosomes, *Am. J. Hum. Genet.*, **21**: 513-515, 1969.
- [68] SIGMUND J., SCHWARZACHER H., MIKELSAAR A., Satellite association frequency and number of nucleoli depend on cell cycle duration and NOR-activity, *Hum. Genet.*, **50**: 81-91, 1979.
- [69] SYSA P., Polimorfizm chromosomów zwierząt domowych, *Post. Biol. Kom.*, **9**: 271-296, 1982.
- [70] TANTRAVAHU R., MILLER D., DEV V., MILLER O., Detection of nucleolus organizer regions in chromosomes of human, chimpanzee, gorilla, orangutan and gibbon, *Chromosoma*, **56**: 15-27, 1976.
- [71] VERMA R., BENJAMIN C., RODRIQUEZ J., DOSIK H., Population heteromorphism of Ag-stained nucleolus organizer regions (NORs) in acrocentric chromosomes of east Indians, *Hum. Genet.*, **59**: 412-415, 1981.
- [72] VERSCHAEVE J., Kirsch-Volders M., Susanne C., Silver staining of human acrocentrics in metaphase does not reflect an induced inhibition in NOR activity, *Exp. Cell Res.*, **136**: 459-461, 1981.
- [73] WACHTLER F., On the identification of active nucleolus-organizing regions in interphase, *Post. Biol. Kom.*, **9**: 235-242, 1982.
- [74] WALLACE H., BIRNSTIEL M., Ribosomal cistrons and the nucleolar organizer, *Biochim. Biophys. Acta*, **114**: 296-310, 1966.
- [75] WARBURTON D., NAYLOR A., WARBURTON F., Spatial relations of human chromosomes identified by quinacrine fluorescence at metaphase, *Humangenetik*: **18**: 297-306, 1973.
- [76] WARBURTON D., HENDERSON A., The relationship of number of rDNA copies per human acrocentric chromosome to satellite association and staining properties of the NOR region. Personal communication. Cited in: *Mammalian Chromosome Newsletter*, **18**: 182, 1977.
- [77] WILLIAMS M., KLEINSCHMIDT J., KROHNE G., FRANKE W., Argyrophilic nuclear and nucleolar proteins of *Xenopus laevis* oocytes identified by gel electrophoresis, *Exp. Cell Res.*, **137**: 341-351, 1982.
- [78] ZANG K., BACK E., Quantitative studies on the arrangement of human metaphase chromosomes. I. Individual features in the association pattern of acrocentric chromosomes of normal males and females, *Cytogenetics*, **7**: 455-470, 1968.
- [79] ZANKL H., ZANG K., Quantitative studies on the arrangement of human

- metaphase chromosomes. IV. The association frequency of human acrocentric marker chromosomes, *Humangenetik*, 23: 259-265, 1974.
- [80] ZHDANOVA N., The acrocentric chromosome associations in human lymphocytes, *Citologia*, 14: 1098-1101, 1972.
- [81] YIP M., FOX P., Correlations between relatives for acrocentric association frequency, *Hum. Genet.*, 59: 245-249, 1981.

Otrzymano: 16 października 1984.

Przyjęto: 12 grudnia 1984.

Adres autorki: ul. K. Marksa 19,
41-808 Zabrze-Rokitnica.

Warunki prenumeraty kwartalnika
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie 400 zł, półrocznie 200 zł

Prenumeratę na kraj przyjmuje się:

- do 10 listopada na I półrocze roku następnego i na cały rok następny,
- do 10 czerwca na II półrocze roku bieżącego.

Instytucje i zakłady pracy zamawiają prenumeratę w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”, w miejscowościach zaś, w których nie ma Oddziałów RSW — w urzędach pocztowych i u doręczycieli.

Czytelnicy indywidualni opłacają prenumeratę wyłącznie w urzędach pocztowych i u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa; konto NBP XV, Oddział w Warszawie, Nr 1153-201045-139-11, w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę pocztą zwykłą jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla zlecających instytucji i zakładów pracy.

Bieżące i archiwalne numery można nabyć lub zamówić we Wzorcowni Ośrodka Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych PAN, Pałac Kultury i Nauki, 00-901 Warszawa oraz w księgarniach naukowych „Domu Książki”.

Subscription orders for all the magazines published in Poland available through the local press distributors or directly through the

Foreign Trade Enterprise
ARS POLONA

00-068 Warszawa, Krakowskie Przedmieście 7, Poland.

Our bankers:

BANK HANDLOWY WARSZAWA S.A.

SPIS TREŚCI

W. KOROHODA, Profesor Jan Adam Zurzycki	121
L. GRĘBECKA, A. GRĘBECKI, B. HREBENDA, Motoryczna reakcja <i>Ameby proteus</i> na utrwalający glutaraldehyd	125
B. RODKIEWICZ, J. BEDNARA, I. GIEŁWANOWSKA, Przemieszczanie się plastydów i mitochondriów w mejozycznych komórkach roślin wyższych	129
A. ROKICKA, Obszary jąderkotwórcze (NOR) w badaniach cytogenetycznych	145