

Paula Iancu

Paula Iancu

GENETICA
- Îndrumător de lucrări practice -



Editura UNIVERSITARIA
Craiova, 2021

Referenți științifici:

Conf.univ.dr. Radu-Lucian Pânzaru

Conf.univ.dr. Gheorghe Matei

Copyright © 2021 Editura Universitaria

Toate drepturile sunt rezervate Editurii Universitaria

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României

IANCU, PAULA

Genetica - îndrumător de lucrări practice / Paula Iancu. - Craiova : Universitaria, 2021

Conține bibliografie

ISBN 978-606-14-1782-7

575

© 2021 by Editura Universitaria

Această carte este protejată prin copyright. Reproducerea integrală sau parțială, multiplicarea prin orice mijloace și sub orice formă, cum ar fi xeroxarea, scanarea, transpunerea în format electronic sau audio, punerea la dispoziția publică, inclusiv prin internet sau prin rețelele de calculatoare, stocarea permanentă sau temporară pe dispozitive sau sisteme cu posibilitatea recuperării informațiilor, cu scop comercial sau gratuit, precum și alte fapte similare săvârșite fără permisiunea scrisă a deținătorului copyrightului reprezintă o încălcare a legislației cu privire la protecția proprietății intelectuale și se pedepsesc penal și/sau civil în conformitate cu legile în vigoare.

INTRODUCERE

Odată cu redescoperirea legilor mendeliene ale eredității în anul 1900, se poate aprecia că s-a născut și genetica, una dintre cele mai fascinante științe biologice, cu o dezvoltare ulterioară foarte rapidă și de-a dreptul uluitoare.

Pentru început, în perioada 1902-1903, Sutton și Boveri au elaborat ipoteza conform căreia factorii ereditari se găsesc plasați în cromozomi. S-a pus astfel baza pentru teoria cromozomică a eredității. Utilizarea insectei *Drosophila melanogaster* pentru întocmirea analizelor genetice și a hărților cromozomiale, a însemnat un progres uriaș pentru genetică.

În anul 1924, Feulgen a demonstrat cu ajutorul tehnicii de colorare a cromozomilor faptul că la nivelul acestora se găsește ADN, care are rol genetic evidențiat de către Avery, McLeod și McCarty (1944), iar structura sa moleculară de Watson, Crick și Wilkins (1953).

Cele mai importante descoperiri din domeniul biologiei moleculare s-au efectuat după cel de-al doilea război mondial prin studiul cromozomilor. Citogenetica, folosind o gamă largă de metode și tehnici de mare finețe, a adus un plus de informație, în special referitor la structura și funcțiile materialului genetic, precum și asupra arhitecturii moleculare a cromozomilor.

Tehnicile de laborator pentru studiul materialului genetic au avut o evoluție foarte rapidă. Până în 1921, cromozomii se studiau numai cu ajutorul secțiunilor în parafină, fapt care nu permitea individualizarea lor. A fost meritul lui Belling de a elabora metoda squash (1921) prin care s-a realizat dispersarea și identificarea cromozomilor. Apoi, utilizarea colchicinei de către Blakeslee și Avery (1937), Levan (1938), un alcaloid extras din bulbii plantei *Colchicum autumnale* pentru blocarea diviziunii celulare în metafază, a condus la obținerea unui număr foarte mare de celule în diviziune și la inducerea experimentală a poliploidiei la plante.

Cultura de celule și țesuturi vegetale a contribuit la dezvoltarea geneticii, în special a ingineriei genetice. În această direcție se pot menționa elaborarea tehnicilor de inducere a haploidiei prin androgeneză experimentală, bazate pe cercetările lui Guha și Maheswari (1964) privind dezvoltarea de embrioni din microspori în cultura de antere și pe studiile lui Bourgin și Nitsch (1967), care au obținut plante haploide dezvoltate complet la tutun.

La plante s-a pus la punct tehnica hibridării celulare prin fuzionarea protoplaștilor devenind posibilă obținerea de amfidiploizi pe cale parasexuală. Primul hibrid interspecific în cadrul genului *Nicotiana* a fost realizat cu ajutorul acestei tehnici de către Carlson, Smith și Dearing (1972).

Tehnica fuzionării celulare a făcut posibilă vizionarea cromozomilor interfazici. Johnson și Rao (1970) au reușit elaborarea metodei condensării premature a cromozomilor, care se bazează pe fuzionarea între celule în diviziune și celule în interfază (G_1 , S, G_2). S-au putut astfel viziona cromozomii interfazici nu numai în celulele somatice, ci și în spermatozoizi.

Metodele de bandare reprezintă un mare progres în studiile de citogenetică. Primele observații au fost făcute de Caspersson, Zech, Modest, Foley și Wagh (1969) pornind de la faptul că mulți fluorocromi pot colora cromozomii, care la microscopia în UV prezintă fluorescență. Prin atașarea unui agent alkilant la molecula de fluorocrom,

acesta se leagă preferențial de perechile de nucleotide guanină-citozină. Regiunile cromozomiale bogate în G-C devin astfel puternic fluorescente, comparativ cu restul cromozomului. Așa a apărut metoda de bandare Q, în care se folosește quinacrina pentru obținerea unei fluorescențe diferențiate. Ulterior, Hilwig și Gropp (1972) au constatat că un derivat al dibenzimidazolului, cunoscut sub denumirea Hoechst 33258, are proprietăți similare quinacrinei, dar mai stabile. Pe această bază, Latt (1973) a elaborat tehnica colorării diferențiate a cromatidelor surori. S-au elaborat și alte metode de bandare cromozomială. Astfel, pe baza existenței unor secvențe repetitive de nucleotide în genomul eucariotelor s-a elaborat tehnica denaturării-renaturării preferențiale a segmentelor respective și a colorării lor diferențiale. Așa a apărut tehnica de bandare C, prin care este colorată preferențial heterocromatina constitutivă, plasată la mamifere de obicei în regiunea centromerică. Din această tehnică a rezultat ulterior bandarea G, în care se folosește soluția Giemsa, elaborată de Gustav Giemsa pentru evidențierea malariei în preparatele de sânge.

Progresele înregistrate în citogenetică au dus la standardizarea complementului cromozomial de la diferite specii, studiat cu ajutorul diverselor metode de bandare.

Genetica modernă beneficiază de o multitudine de tehnici de mare finețe și eficiență pentru inducerea de mutații și identificarea lor. De asemenea, au fost elaborate mai multe teste pentru determinarea potențialului mutagen al unor factori din mediul înconjurător, fapt de mare semnificație pentru protecția ecosistemelor din natură.

Lucrarea de față încearcă să cuprindă o sinteză a metodelor și tehnicilor de bază folosite în studiile de genetică clasică și modernă.

1. SINCRONIZAREA DIVIZIUNII CELULARE. DURATA CICLULUI MITOTIC ȘI A MEIOZEI

În celulele în curs de diviziune au loc fenomene ciclice care duc la transformarea în intervale mai mult sau mai puțin regulate, a unei celule-mamă în două celule-fiice. Succesiunea acestor fenomene poartă denumirea de ciclu celular sau ciclu mitotic (fig. 1). Aceasta este caracteristica fundamentală a tuturor organismelor vii. Înainte însă de diviziune, toate celulele trec în mod necesar printr-un stadiu de creștere, care la nivel de organism corespunde perioadei de tinerețe a materiei vii, de construire a organismelor pluricelulare; la nivel celular, în cazul unor țesuturi reproducătoare, meristeme de creștere și al organismelor unicelulare stările de creștere și de diviziune sunt permanente.

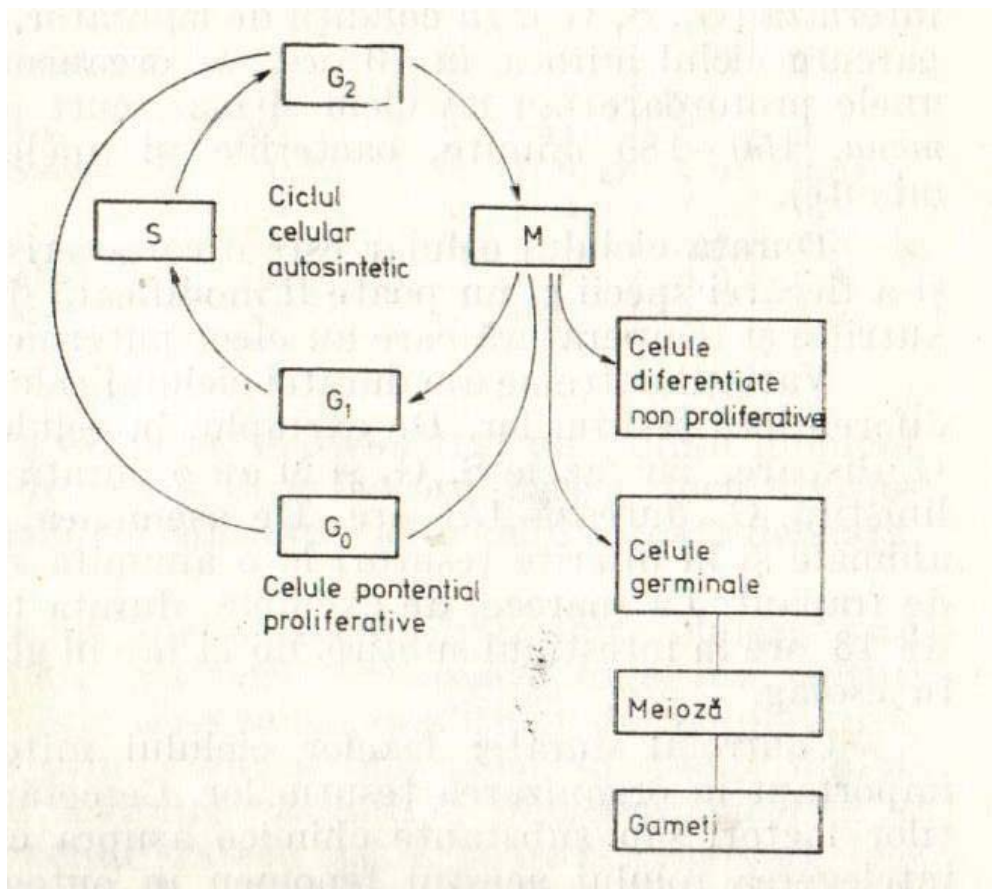


Fig. 1. Schema ciclului mitotic.

Ciclul celular are două faze principale întotdeauna tranzitorii: de sinteză a ADN nuclear (S) și mitoza (M) și două faze intermediare: presintetică (G₁) și premitotică (G₂). Se poate defini și un stadiu G₀ care corespunde unei etape de oprire sau de așteptare a celulei în faza G₁ sau G₂.

La cele mai multe plante și animale, în condiții normale de nutriție și temperatură, un ciclu mitotic este complet în 24 de ore sau chiar mai puțin. De exemplu, din cele 20 de ore ale unui ciclu mitotic tipic, aproximativ 1-2 ore reprezintă mitoza (diviziunea propriu-zisă), restul fiind interfază (G1, S, G2). În condiții de laborator, unele linii de celule animale parcurg un ciclu mitotic în 10 ore, iar organismele unicelulare (drojdiile și unele protozoare) au un ciclu și mai scurt (protozoarul *Tetrahymena* 15-180 minute; bacteriile și unele organisme procariote 20 minute).

Durata ciclului celular este o caracteristică a fiecărui tip de celulă și a fiecărei specii și nu poate fi modificată decât în condiții deosebite de nutriție și temperatură care au un efect puternic (tabel 1). Variații extreme ale duratei ciclului celular se înregistrează în cursul diferențierii țesuturilor. De exemplu, în celulele inițiale ale caliptrei faza G1 dispăre, iar fazele S, G2 și M au o durată maximă, în timp ce în zona liniștită, G1 durează 151 de ore. De asemenea, în cursul embriogenezei la animale și în diferite țesuturi la o anumită specie, fenomenul este la fel de frapant. La șoarece, durata totală a ciclului mitotic este de 13 ore în intestinul subțire, de 71 ore în glandele mamare și de 113 ore în esofag (Raicu și colab., 1983).

Controlul duratei fazelor ciclului mitotic constituie un element important în organizarea țesuturilor. Cercetările privind influența diferiților sau substanțe chimice asupra ciclului mitotic pot duce la înțelegerea rolului acestui fenomen în ontogeneză și diferențiere. Dar, pentru astfel de cercetări este necesară sincronizarea populațiilor celulare, care oferă posibilitatea măsurării lungimii ciclului celular și a diferitelor faze, precum și posibilitatea de a lucra pe un număr important de celule care se găsesc în același stadiu. Metodele folosite pentru sincronizare se bazează pe oprirea temporară a evoluției celulelor într-un anumit moment al ciclului pentru acumularea de celule. Când factorul care a oprit diviziunea este eliminat din mediu, celulele continuă ciclul celular toate deodată, cu aceeași viteză.

Tabel 1

Durata ciclului mitotic la diferite specii
(după Essad, 1974)

Materialul studiat	Factorul care influențează ciclul mitotic	Durata ciclului mitotic total (ore)	G1	S	G2	M
<i>Avena pilosa</i>	-	8,85	0	4,25	2,9	1,7
<i>Allium cepa</i>	-	12,8	1,5	6,5	2,4	2,3
<i>Hordeum sativum</i>	-	12,0	2,6	4,9	3,4	1,1
<i>Vicia faba</i>	-	18,0	5,3	6,0	5,2	1,5
<i>Pisum sativum</i>	-	13-14	4-5	4,5	3-3,3	1,2-1,4
<i>Avena strigosa</i>	Poliploidia					
	2n	9,8	2,45	3,55	2,00	1,8
	4n	9,9	1,00	3,75	3,55	1,6
<i>Tradescantia paludosa</i>	Temperatura					
	13°C	51,0	15,4	22,5	8,3	5,1
	21°C	20,8	5,8	10,9	2,5	1,7
	30°C	16,0	2,4	9,5	2,4	1,7
<i>Zea mays</i>	Diferențierea inițialele caliptrei;	15	0	8	5	2
	zona liniștită;	174	151	9	11	3
	cilindrul central	22	2	11	7	2

Rezultate destul de bune în sincronizarea diviziunii celulare s-au obținut la organisme unicelulare (bacterii, protozoare, alge) sau culturi de celule animale și vegetale prin alternanța condițiilor de temperatură, prin nutriție insuficientă sau prin acțiunea diferitelor substanțe inhibitoare (antimetaboliți). Dintre aceștia se menționează: fluordezoxiuridina și excesul de timidină care blochează sinteza ADN, hidroxiureea care blochează diviziunea la sfârșitul fazei G1 și distruge celulele în faza S, colchicina care blochează activitatea fusului nuclear, 5-aminouracilul, etc. Procedeele fizice de triere a celulelor în diferite faze ale ciclului celular, sunt folosite în cazul culturilor de celule. Se știe că prin spălarea culturii sunt antrenate celule în mitoză a căror aderență la vas este mai redusă decât a celulelor din celelalte faze.

1.1. Sincronizarea diviziunii celulare și determinarea duratei ciclului mitotic în meristemele radiculare

Meristemele radiculare constituie principalul material pentru studiul duratei ciclului mitotic. Elaborarea modelului ciclului mitotic general acceptat, al lui Howard și Pelc (1953) s-a bazat pe studii de cinetica populațiilor celulare, precum și pe studii de determinare a ciclului mitotic și a fazelor sale cu ajutorul izotopilor radioactivi în meristeme radiculare.

1.1.1. Metoda populațiilor sincrone de celule 4n (după Van't Hof și Colan, 1960)

Autorii au pornit de la ideea că într-o populație mare de celule în diviziune se poate crea cu ajutorul colchicinei o populație mică de celule 4n. Celulele tetraploide astfel marcate, precum și cele rezultate din diviziunea lor pot fi recunoscute în cursul mai multor cicluri mitotice.

Metoda constă în următoarele:

- germinarea semințelor la temperatură constantă (20-23°C);
- tratarea rădăcinilor jumătate de oră cu o soluție de colchicină ($3,76 \times 10^{-4}M$).

Concentrații mai mari sau o perioadă de tratament mai mare reduce gradul de refacere al celulelor;

- transferul rădăcinilor în apă de robinet;
- fixarea a câte 4-5 rădăcini în alcool etilic-acid acetic glacial (3:1) din oră în oră, timp de 24-30 ore;

- efectuarea de preparate squash colorate Feulgen;
- determinarea frecvenței celulelor 4n în metafaze la fiecare timp de fixare.

Frecvența acestor celule se determină folosindu-se indicele poliploid, care reprezintă numărul de celule 4n la 100 celule. Timpul dintre două maxime succesive ale indicelui poliploid reprezintă durata ciclului mitotic. La *Pisum sativum* ($2n=12$) la 22,5°C, durata ciclului mitotic determinată de autori prin această metodă este de 12 ore.

Sincronizarea se menține un număr relativ redus de cicluri mitotice, de obicei 3-4, iar după 6 diviziuni de pierde. Pentru cercetări de mare precizie se folosesc numai prima și a doua diviziune de la marcare.

Această metodă se poate folosi nu numai pentru determinarea lungimii ciclului mitotic în condiții normale, ci și sub acțiunea a diverși factori exogeni care pot provoca prelungirea sau scurtarea intervalului dintre două diviziuni (Raicu și Stoian, 1967) sau chiar blocarea diviziunii (fig. 2).

La *Vicia faba* (Ronchi, Buiatti și Ipata, 1967), durata ciclului mitotic determinată cu ajutorul acestei metode la 19°C, în condiții normale este de 16-18 ore, în timp ce sub influența trietilenmelaminei, agent alkilant puternic, se prelungește la 24 de ore la pH 5 și la 34 de ore la pH 6,7.

Există o variantă a metodei populațiilor sincrone de celule 4n, care constă în:

- efectuarea unui tratament continuu cu aceeași concentrație de colchicină;
- fixarea rădăcinilor din oră în oră în alcool etilic-acid acetic glacial (3:1) timp de 30-40 de ore;
- efectuarea de preparate squash;
- determinarea frecvenței celulelor 2n, 4n, 8n.

Durata ciclului mitotic este reprezentată de perioada de timp dintre începutul tratamentului și apariția primelor celule 4n.

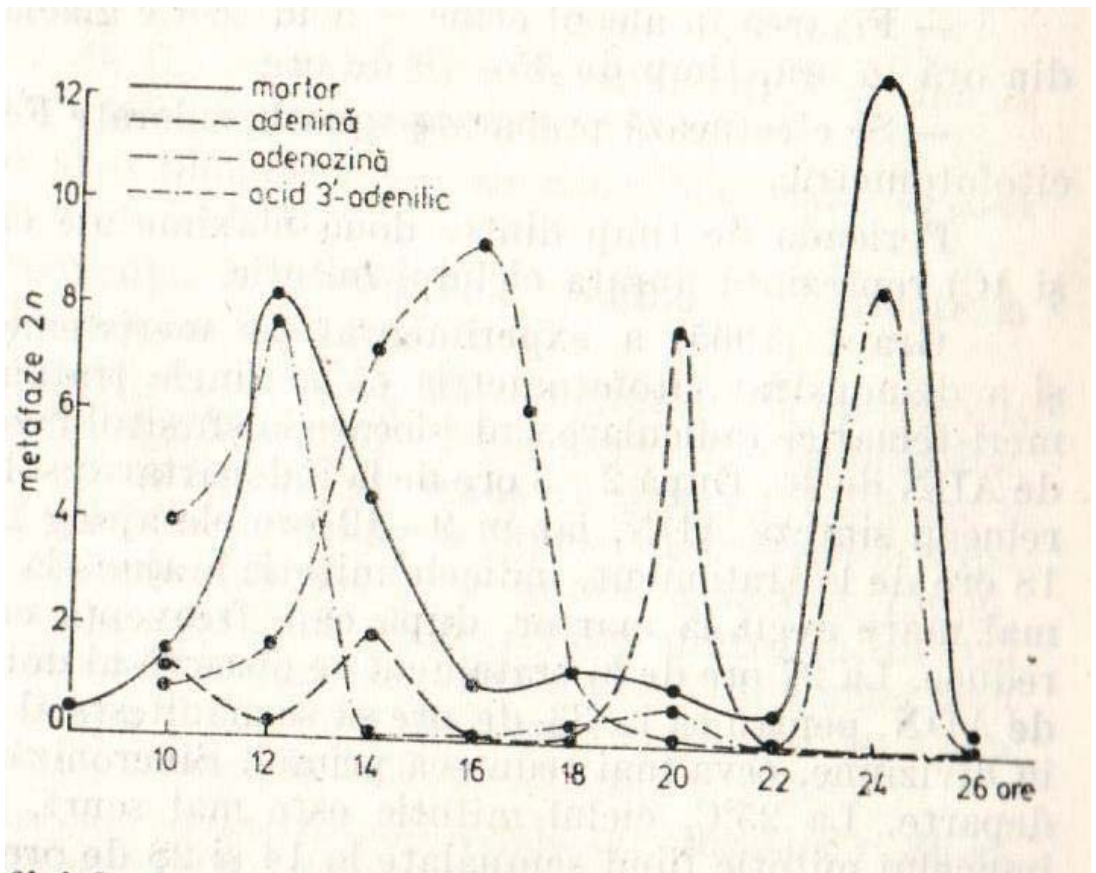


Fig. 2. Durata ciclului mitotic la *Vicia faba* sub influența unor tratamente cu diferite substanțe, determinată prin metoda populațiilor sincrone de celule 4n

1.1.2. Metoda creării artificiale de populații sincrone de celule 4n printr-un tratament continuu cu 0,5% colchicină

Prin această metodă s-a determinat frecvența metafazelor diploide, tetraploide și octoploide în rădăcini fixate în alcool etilic-acid acetic glacial (3:1) la diferite intervale de timp. Buiatti și Ronchi (1963) determinând la *Vicia faba* lungimea ciclului mitotic în condiții normale (19°C și întuneric) și sub influența trietilenmelaminei, au constatat că primele celule 4n apar la 18 ore de la începutul tratamentului la varianta martor și la 30 de ore la materialul supus influenței trietilenmelaminei. După aceste intervale de timp s-a observat o reducere rapidă a frecvenței celulelor 2n și o mărire a celor 4n. la varianta martor după 30 de ore de la începerea tratamentului frecvența celulelor 2n a fost de numai 10%, restul de 90% fiind majoritatea celule 4n și câteva 8n.

1.1.3. Metoda de sincronizare a diviziunii unei populații celulare cu 5-aminouracil (după Prenskey și Smith, 1965)

Metoda constă în faptul că 5-aminouracilul (5-AU) provoacă blocarea ciclului mitotic la sfârșitul fazei G1, astfel încât sinteza ADN nu se mai poate realiza. După eliminarea inhibitorului, toate celulele intră simultan în faza S, apoi G2 și în M, realizându-se astfel sincronizarea diviziunii celulare.

Se procedează astfel:

- germinarea semințelor la temperatură constantă (19-22°C);
- imersarea rădăcinilor într-o soluție aerată de 5-AU în concentrație de 500 ppm, 48 de ore;
- îndepărtarea soluției, spălarea rădăcinilor și transferarea lor în apă de robinet;
- fixarea în alcool etilic-acid acetic glacial a câte 4-5 rădăcini din oră în oră timp de 35-40 de ore;
- efectuarea de preparate squash, colorate Feulgen și examinarea lor citofotometric.

Grant (1965) a experimentat pe meristeme de *Hordeum vulgare* și a demonstrat citofotometric că la finele tratamentului toate celulele meristemate radiculare sunt blocate la sfârșitul fazei G1, având o cantitate de ADN de 2C. După 2-3 ore de la îndepărtarea soluției de 5-AU, celulele reîncep sinteza ADN, iar la 9-12 ore ele ajung în bloc în faza 4C. La 18 ore de la tratament, indicele mitotic a ajuns la 26%, fiind de 4-5 ori mai mare decât la martor, după care frecvența celulelor în diviziune se reduce. La 27 de ore de la tratament se observă al doilea maxim al cantității de ADN, pentru ca la 33 de ore să se manifeste al doilea maxim de celule în diviziune, ceva mai redus ca primul. Sincronizarea nu se menține mai departe. La 25°C, ciclul mitotic este mai scurt, cele două maxime ale indicelui mitotic fiind semnalate la 14 și 28 de ore de la tratament.

Această metodă permite nu numai studiul ciclului mitotic, ci face posibilă obținerea unei populații de celule aflate într-o anumită fază de diviziune la un moment dat: profază, metafază, anafază, telofază. În cazul unor cercetări în care se urmărește frecvența aberațiilor într-o anumită fază a diviziunii celulare, metoda creează posibilități de studiu rapid al unui număr mare de celule care pot fi blocate în faza respectivă, datorită diviziunii lor sincrone.

1.1.4. Metode microautoradiografice de determinare a duratei ciclului mitotic

Aceste metode se bazează pe faptul că timidina (precursor al dezoxitimidintrifosfatului) marcată cu ^3H poate fi încorporată direct în ADN în faza de sinteză.

Tehnica de lucru (după Quastler și Sherman, 1959):

- semințele germinează la temperatură constantă (23°C);
- se trec apoi în soluție nutritivă Hoegland, la aceeași temperatură, minimum 24 de ore;
- se efectuează tratamentul cu timidină ^3H , în concentrație de 1-2 $\mu\text{Ci/ml}$, 15 minute-2 ore, în funcție de specie;
- prefixarea materialului se face cu o soluție de colchicină 0,05%, timp de 1,5 ore: pentru determinarea indicelui mitotic nu se prefixează materialul;
- se trece materialul în apă de robinet;
- fixarea în alcool etilic-acid acetic (3:1) a câte 4-5 rădăcini, din oră în oră, de la finele tratamentului cu colchicină, timp de 25-30 de ore;
- hidroliza în HCl 1N la 60°C timp variabil în funcție de specie, colorare Feulgen;
- se fac preparate de tip squash, iar autoradiografiile se fac la întuneric, folosindu-se filme sau emulsie specială;
- pentru impresionarea filmului sau a emulsiei, materialul se lasă 3-4 săptămâni la întuneric, la $2-4^{\circ}\text{C}$;
- se determină frecvența, în procente, a metafazelor marcate la fiecare interval de timp la care s-a fixat materialul.

Prin această metodă se pot determina atât lungimea totală a ciclului mitotic, cât și durata diferitelor faze. Studiul frecvenței celulelor marcate, la diferite intervale de timp de la marcaj, arată că la început are loc o creștere a acestei frecvențe până la un maxim, apoi o descreștere și după un anumit timp o nouă creștere ajungând la un al doilea maxim. Lungimea totală a ciclului mitotic este dată de intervalul dintre momentul când se realizează jumătate din frecvența maximă a primei și a celei de a doua curbe ascendente. Grant și Heslot (1966) au determinat la *Vicia faba* lungimea totală a ciclului mitotic, la 19°C , de 18 ore.

Interpretarea rezultatelor se face după metoda lui Quastler și Sherman (1959) și metoda Wimber (1960). Pentru a înțelege mai bine modalitatea de interpretare s-au reprezentat într-un grafic date ipotetice pe baza cărora s-a calculat durata unui ciclu mitotic și a fazelor sale (fig. 3).

Perioada de timp în care numărul de celule marcate atinge 50% din totalul celulelor marcate reprezintă durata fazei G2 + profaza. Durata fazei G2 + profaza s-a estimat la 5,5 ore. Durata lui G2 se obține prin scăderea duratei profazei. În exemplul reprezentat grafic 0,64 ore reprezintă profaza. Deci, $G2 = 5,5 - 0,64 = 4,86$ ore.

Faza de sinteză S este definită prin lungimea platoului primei curbe minus timpul de marcare și se determină prin măsurarea distanței între cele două niveluri de marcare de pe panta ascendentă și cea descendentă a curbei, unde celulele marcate ating 50% din totalul celulelor. În exemplul luat, faza S poate fi estimată la 6,4 ore.

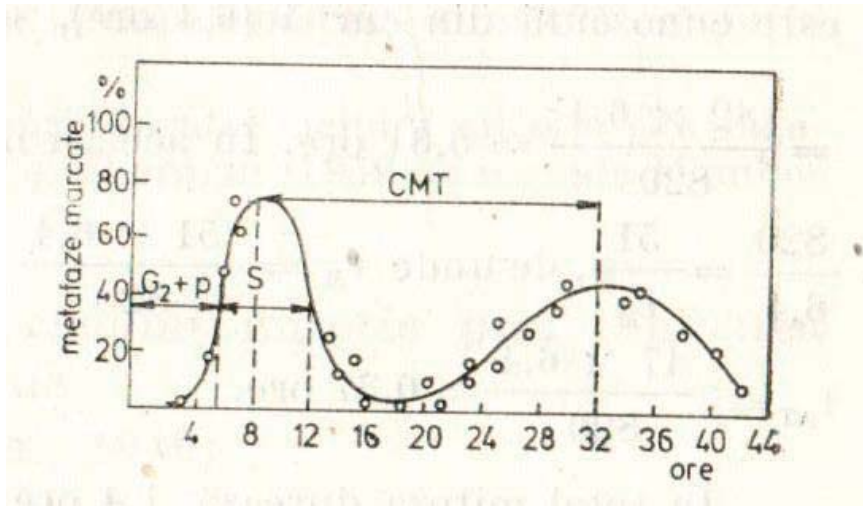


Fig. 3. Durata totală a ciclului mitotic și a fazelor componente, determinată prin metoda microautoradiografiei

Durata ciclului mitotic (CMT) poate, de asemenea, să fie estimată din același grafic deoarece cele două vârfuri ale curbei reprezintă cele două valori de celule sincronizate care intră în metafază după marcarea. Distanța dintre punctele de mijloc ale vârfurilor reprezintă lungimea medie a ciclului mitotic total și anume, aproximativ 22 ore.

Durata mitozei se calculează după metoda lui Sparvoli și colab., (1966). După marcarea, celulele care au fost în faza S în timpul tratamentului se identifică ușor. Pornind de la faptul că numărul de celule în fiecare stadiu al mitozei la un moment dat este proporțional cu timpul necesar pentru completarea acestui stadiu, se poate aplica formula lui Sparvoli (1966):

$$\frac{n_s}{t_s} = \frac{n_p}{t_p} = \frac{n_M}{t_M} = \frac{n_{aT}}{t_{aT}}$$

- în care: n_s = numărul de celule în faza de sinteză;
 n_p = numărul de celule în profază;
 n_M = numărul de celule în metafază;
 n_{aT} = celule în anafază și telofază;
 t_s = timpul necesar fazei de sinteză;
 t_p = timpul necesar profazei;
 t_M = timpul necesar metafazei;
 t_{aT} = timpul necesar anafazei și telofazei.

Se numără aproximativ 1000 de celule marcate în faza de sineză sau în diviziune la o oră după tratament și se obține: $n_s = 820$, $n_p = 82$, $n_M = 51$, $n_{aT} = 47$. Având în vedere că valoarea lui t_s este cunoscută din curbă (6,4 ore), se obține:

$$\frac{820}{6,4} = \frac{82}{t_p} \text{ de unde } t_p = \frac{82 \times 6,4}{820} = 0,64 \text{ ore.}$$

În același mod se obțin celelalte necunoscute: $\frac{820}{6,4} = \frac{51}{t_m}$, de unde $t_m = \frac{51 \times 6,4}{820} = 0,40$ ore; $\frac{820}{6,4} = \frac{47}{t_{AT}}$, de unde $t_{AT} = \frac{47 \times 6,4}{820} = 0,37$ ore. În total mitoză durează 1,4 ore.

Pentru calculul duratei fazei G1 se scade din durata ciclului mitotic total mitoză + G2 + S, obținându-se o durată medie de 9,34 ore.

Cercetările lui Van't Hof (1965) privind ciclul mitotic la 6 specii de plante au demonstrat că acesta este variabil ca durată, fapt datorat, în primul rând, cantității diferite de ADN/nucleu. La *Crepis capilaris*, *Impatiens balsamina* și *Lycopersicum esculentum*, la care cantitatea de ADN este relativ redusă, ciclul mitotic este mai scurt, în timp ce la *Allium cepa*, *A. fistulosum* și *Tradescantia paludosa*, la care nucleii sunt mai mari și conțin mai mult ADN, ciclul mitotic reflectă durata fazei S în care se sintetizează ADN. Corelația directă dintre lungimea fazei S, respectiv a ciclului mitotic și cantitatea de ADN/celulă ce trebuie sintetizată, se realizează datorită ratei relativ constante a replicării ADN.

Tehnica de lucru (după Tițu, 1966):

Autorul a efectuat determinări la secară, tomate și sfecla de zahăr.

- rădăcinile (10 mm) nedetașate de semințe se scufundă într-o soluție de timidină ^3H în concentrație de $2\mu\text{Ci/ml}$, în care se țin 24 de ore;

- după ce se fixează rădăcinile 9 din 2 în 2 ore pe parcursul celor 24 de ore), se efectuează preparate prin metoda secționării și includerii în parafină (vezi cap. 2);

- secțiunile pregătite după metoda obișnuită, înainte de colorare, se tratează cu ribonuclează 2%, timp de 3 ore, așezându-se în cutii Petri, pe hârtie de filtru umedă. Peste secțiuni se pun câteva picături de ribonuclează; se introduc la 38°C și se are grijă permanent ca deasupra secțiunilor să fie un strat de ribonuclează, prin adăugare de picături;

- preparatele se spală cu apă de robinet, 12 ore, apoi în două băi de apă distilată, câte 5 minute;

- se deshidratează în două băi de alcool 96° , câte 5 minute și se usucă la aer;

- pe preparate se depune un substrat conținând gelatină (0,385 g), alaun de crom 3% (2,5 ml) și apă distilată (90 ml), peste care se pune emulsia (EN₂IFA); expunerea durează 20 de zile la 4°C ;

- autoradiografiile se dezvoltă și se fixează;

- preparatele se colorează și se observă la microscop în scopul depistării nucleilor în care a avut loc sinteza ADN și deci, s-a încorporat timidina. Nucleii se consideră marcați dacă deasupra lor se află cel puțin 3 granule.

Pentru interpretarea determinării duratei ciclului mitotic și a fazelor sale se folosesc metoda Quastler și Sherman (1959) și metoda Wimber (1960)(vezi figura 3).

1.1.5. Determinarea lungimii ciclului mitotic prin inhibarea formării plăcii ecuatoriale (după Kihlman și Levan, 1949)

O serie de agenți chimici, mai ales cei din grupul oxipurinelor metilate cum sunt: cafeina, teobromina, teofilina, etc., au capacitatea de a bloca formarea plăcii ecuatoriale în cursul diviziunii celulare, fără a afecta însă sinteza ADN și replicația cromozomilor, respectiv a nucleilor. Prin utilizarea acestor agenți în cursul unei singure diviziuni se