

Untersuchungen über RNA- und Proteinbiosynthesen in aktivierten und temperaturblockierten *Agrostemma githago*-Samen: Einfluss von Benzylaminopurin

M. HECKER

Sektion Biologie, FG Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie,
Universität Greifswald*

Studies on Protein and RNA Syntheses in Activated and Temperature-Blocked Seeds of *Agrostemma githago*: The Influence of Benzylaminopurine

Abstract. Embryos of *Agrostemma githago* seeds blocked by higher temperature are suitable objects for the study of the regulation of gene expression independent of transcriptional processes. Germination of afterripened seeds can be prevented by imbibing at 30 °C, whereas at 20 °C germination will be completed after 30 h of soaking (BORRIS 1956). In temperature-blocked embryos RNA is synthesized with undiminished intensity, whereas DNA and protein syntheses are remarkably reduced. Equal amounts of poly(A)-RNA (probably mRNA), enriched by affinity chromatography on oligo(dT)-cellulose columns, are detected in blocked and activated embryos.

We suggest that in blocked embryos not synthesis itself, but the availability of mRNA to polysomal fraction is reduced.

Benzylaminopurine is able to break secondary dormancy of *Agrostemma githago* seeds. In benzylaminopurine-treated seeds there is only a slight increase of the incorporation of ¹⁴C-L-leucine in protein.

Additional index words: seed germination, seed dormancy, cytokinin, control of gene expression, disc electrophoresis, poly(A)-RNA.

Blockierte und aktivierte pflanzliche Embryonen werden in zunehmendem Masse als Objekte für entwicklungsbiologische Forschungen ausgewählt, da an ihnen die Steuerungsmechanismen von Wachstums- und Differenzierungsprozessen anschaulich und übersichtlich studiert werden können.

Nach unserer heutigen Kenntnis werden entwicklungsbiologische Prozesse durch differentielle Genexpression gesteuert, deshalb konzentrierten wir uns auf den Vergleich des Nucleinsäuren- und Proteinmetabolismus blockierter und aktivierter Embryonen. Dabei galt es zu prüfen, ob Unterschiede im Nucleinsäuren- und Proteinstoffwechsel mit der physiologischen Aktivität der Samen in einem kausalen Verhältnis stehen oder zufälliger Natur sind.

Bei der Objektwahl stand eine einfach zu handhabende Beeinflussung des physiologischen Zustandes der Samen im Vordergrund. Samen von *Agrostem-*

Eingegangen am 8. Januar 1976

* Adresse: Sektion Biologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, DDR 22 Greifswald, Grimmer Str. 88.

ma githago erfüllen diese Forderung, da sich ihre Keimungsbereitschaft in vielfältiger Weise steuern lässt (BORRISS 1956). Unabhängig von der Dormanz frisch geernteter Samen kann auch nachgereiftes Saatgut durch höhere Temperaturen (BORRISS 1956) oder durch eine Bestrahlung mit dunkelrotem Licht (HECKER 1975) in eine sekundäre Ruhe versetzt werden.

Weiter zurückliegende Untersuchungen über das Enzymmuster temperaturblockierter *Agrostemma*-Samen zeigten, dass Korrelationen zwischen der Aktivität einiger Enzyme und dem physiologischen Zustand der Samen bestehen: Mehrere Enzyme wurden in Embryonen aus temperaturblockierten Samen mit erheblich verminderter Aktivität bestimmt (vgl. BORRISS *et al.* 1967). Diese Ergebnisse deuten auf eine Depression von Enzymsynthesen hin, eine Schlussfolgerung, die durch unsere Untersuchungen erhärtet werden konnte. Es stellte sich nämlich heraus, dass Embryonen aus temperaturblockierten Samen Proteine mit deutlich geringerer Intensität synthetisieren als solche aus aktiviertem Saatgut. Im Gegensatz zu dormanten *Agrostemma*-Samen, die Proteinsynthesen mit unverminderter Intensität betreiben, scheint hier der Entwicklungsblock mit einem Translationsblock gekoppelt zu sein (vgl. HECKER und BORRISS, in Vorb.).

Cytokinine spielen bei der Steuerung des Aktivitätswechsels von Samen eine wesentliche Rolle (vgl. KHAN 1971, WAREING und SAUNDERS 1971). Nach Untersuchungen von BORRISS (1967) kann die Blockierung der bei 30 °C angequollenen *Agrostemma githago*-Samen durch Cytokinine aufgehoben werden. Es erschien daher aussichtsreich zu prüfen, ob diese physiologische Aktivierung mit einer Aufhebung des Translationsblocks einhergeht.

Material und Methoden

Als Untersuchungsobjekt dienten nachgereifte Samen von *Agrostemma githago* L., Sorte Gatersleben, Ernte 1974 (zur Charakterisierung des Saatgutes siehe BORRISS 1956), die in Petrischalen auf feuchtem Fliesspapier bei 20 oder 30 °C im Dunkeln angequollen wurden.

Bestimmung der Protein-, RNA- und DNA-Synthese

Nach einer bestimmten Quellungszeit wurden je 20 Embryonen aus den Samen isoliert und 1 h mit 37 kBq ^{14}C -L-Leucin-(u) (spez. Akt. 6845 MBq mmol⁻¹), 2 h mit 370 kBq ^3H -Uracil-(5) (spez. Akt. 1010 GBq mmol⁻¹) oder 2 h mit 370 kBq ^3H -Thymidin-(methyl) (spez. Akt. 207 GBq mmol⁻¹) bei 20 °C inkubiert. Im Quellungs- und Inkubationsmedium (Volumen 5 bzw. 2 ml) waren jeweils 30 µg ml⁻¹ Chloramphenicol enthalten, dessen Zugabe jedoch weder auf die Protein- noch RNA- und DNA-Synthese einen Einfluss hatte. Die Bestimmung der Protein-, RNA- und DNA-Synthese erfolgte wie an anderer Stelle beschrieben (HECKER 1974a). Die Radioaktivität wurde in einem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer, Tri Carb 3320 (Packard) bestimmt. Die Präkursor-Aufnahme- bzw. -Einbaurate wurde in Impulsen pro Minute und Embryo bzw. in % Einbau bezogen auf die Gesamtaufnahme angegeben.

1 µCi = 37 kBq; 1 Ci = 37 GBq.

RNA-Hybridisierung an Oligo(dT)-Cellulose

20 Embryonen wurden aus 20 h bei 20 bzw. 30 °C gequollenen *Agrostemma*-Samen isoliert und 2 h mit 3,7 MBq ³H-Uracil-(5) (spez. Akt. 1010 GBq mmol⁻¹) inkubiert. Die RNA wurde mit eiskaltem 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 9,0, 1 % Na-Dodecylsulfat, 0,01 M MgCl₂, 0,5 % Bentonit, 0,25 % 8-Hydroxychinolin extrahiert und mit einem Phenol-Chloroform-Gemisch (1 : 1) bei 4 °C enteweisst. Eine Reextraktion der in der Zwischenphase verbliebenen RNA bei 60 °C schloss sich an. Beide wässrigen Phasen wurden vereinigt und weitere Male bei Zimmertemperatur mit einem Phenol-Chloroform-Gemisch geschüttelt. Die Nucleinsäuren (2%ig an Na-Acetat) wurden nach Zugabe von eiskaltem Äthanol über Nacht bei -20 °C ausgefällt, mit 70%igem Äthanol gewaschen und im Bindungspuffer für die Hybridisierung (0,05 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,6; 0,0005 M Na₂-EDTA, 0,4 M NaCl, 0,1 % Na-Dodecylsulfat) aufgenommen. Zur Gewinnung der Poly(A)-RNA wurde ein Teil der RNA bei Zimmertemperatur auf eine Oligo(dT)-Cellulose-Säule gegeben, deren Kapazität mehrmals mit Poly(A) überprüft wurde. Durch sorgfältiges Waschen mit Bindungspuffer konnte die nicht hybridisierte RNA vollständig von der Säule gelöst werden. Die Elution der Poly(A)-RNA gelang mit 0,05 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,6, 0,0005 M Na₂-EDTA, 0,1 % Na-Dodecylsulfat (Elutionspuffer) bei 50 °C. Die RNA wurde auf Filterpapierscheiben (Ø = 2 cm) aufgetragen und mit Trichloressigsäure, Äthanol und Äther gewaschen, anschliessend wurde die Radioaktivität bestimmt.

Polyacrylamidgel-Disk-Elektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Embryoproteine wurden je 20 Embryonen aus Samen, die 18 h bei 20 bzw. 30 °C angequollen waren, isoliert und 2½ h bei 20 °C mit 185 kBq ¹⁴C-L-Leucin-(u) (spez. Akt. 6845 MBq mmol⁻¹) inkubiert. Die Extraktion der Embryo-Proteine und die Disk-Elektrophorese wurden wie früher beschrieben (HECKER 1976a) durchgeführt (basisches Gelsystem pH 8,9, Polyacrylamid-Konzentration: 7,5). Die kurze Zeit auf Trockeneis eingefrorenen Gele wurden mit einem Gelschneider nach MATSUMURA und NODA (1973) in 1 mm dicke Scheiben zerschnitten, die durch die Zugabe von 250 µl 30%iges H₂O₂, 1%ig an NH₄OH konz. nach 2 bis 3 h bei 50 °C aufgelöst werden konnten. Nach Zugabe von 10 ml Aquasol wurde die ¹⁴C-Aktivität im Tri Carb gemessen.

Ergebnisse

Die Keimungsbereitschaft nachgereifter Samen von *Agrostemma githago* lässt sich durch die Wahl der Quellungsbedingungen einfach steuern: Durch höhere Temperaturen oder im Dunkelrotfeld kann die Keimung vollständig verhindert werden, Behandlung temperaturblockierter Samen mit Cytokinen hebt den temperaturbedingten Entwicklungsblock auf (Abb. 1).

Für den Radiculadurchbruch scheinen einige der in der Quellungsphase ablaufenden Protein- und RNA-Synthesen wesentlich zu sein, da eine Hemmung der Nucleinsäuren- und Proteinsynthesen eine erheblich verminderte Keimungsrate bewirkt (Tabelle 1).

Embryonen aus temperaturblockierten Samen von *Agrostemma githago* sind durch eine deutlich reduzierte Protein- und DNA-Synthese charakterisiert, während RNA-Synthesen mit unverminderter Intensität ablaufen

TABELLE 1

Einfluss von spezifischen Inhibitoren auf die Keimung, Protein- und RNA-Synthese von *Agrostemma githago*-Samen

Variante	% Keimung nach 40 h bei 20 °C	% Inhibition der RNA-Synthese nach 20 h	Proteinsynthese
Kontrolle	97	0	0
6-Methylpurin (200 µg ml ⁻¹ , Sigma Chem. Comp.)	1	56	—
Cycloheximid (100 µg ml ⁻¹ , Ferak Berlin)	8	—	82

(HECKER und BORRIS, in Vorb., Abb. 2). Dabei ist die Depression der Proteinsynthese sowohl in den Kotyledonen als auch in den Achsenorganen nachweisbar, wogegen die DNA-Synthese nur in den Radiculen und nicht in den Keimblättern gehemmt wird (Tabelle 2).

TABELLE 2

¹⁴C-L-Leucin-Einbau und ³H-Uracil-Einbau durch Kotyledonen und Achsenorgane aus temperaturblockierten und aktivierten *Agrostemma*-Samen
Quellungszeit: 24 h bei 20 bzw. 30 °C, danach ein- (Leucin-Einbau-Experiment) oder zwei-stündige Inkubation (Uracil-Einbau-Versuch) mit radioaktiven Präkursoren bei 20 °C.
Die durch Embryoteile aus aktivierten *Agrostemma*-Samen erreichten Einbauraten wurden gleich 100 % gesetzt, in der Tabelle wurde die Hemmung der RNA- bzw. Protein-Synthese temperaturblockierter Embryoteile in % angegeben.

	¹⁴ C-L-Leucin-Einbaus der bei 30 °C angequollenen Samen	% Inhibition des ³ H-Thymidin-Einbaus
Achsenorgane	44 %	70,5 %
Kotyledonen	51 %	0 %

Die mit dem Einbauexperiment erhaltenen Befunde könnten prinzipiell durch sich verändernde Pool-Größen beeinträchtigt werden. Da ähnliche Ergebnisse auch nach einer „Verdünnung“ der radioaktiven Verbindungen mit nicht markierten Vorstufen (sinkende spezifische Aktivität bei stark ansteigender Konzentration der applizierten Präkursoren) erhalten wurden, sind grössere Unterschiede im Leucin-, Uracil- und Thymidin-Pool, die die Interpretation der erhaltenen Werte erschweren würden, nicht anzunehmen.

Überlagerte Samen mit stark erniedrigter Keimungsbereitschaft verhalten sich hinsichtlich der DNA-, RNA- und Proteinsynthese wie temperaturblockierte (HECKER 1974a). Dagegen zeigen primär dormante und durch

Dunkelrot in eine sekundäre Ruhe versetzte Samen keine Unterschiede zu voll aktiven Samen, so dass vermutlich ein spezifischer Block die Entwicklungshemmung dieser Samen verursacht (ausführliche Darstellung bei HECKER 1974b, 1975, HECKER und BORRIS, in Vorb.).

Nach unserer Auffassung könnte die Translationshemmung die mangelnde Keimfähigkeit temperaturblockierter Samen hinreichend gut erklären. Die Auftrennung radioaktiv markierter Proteine mittels Polyacrylamid-Disk-

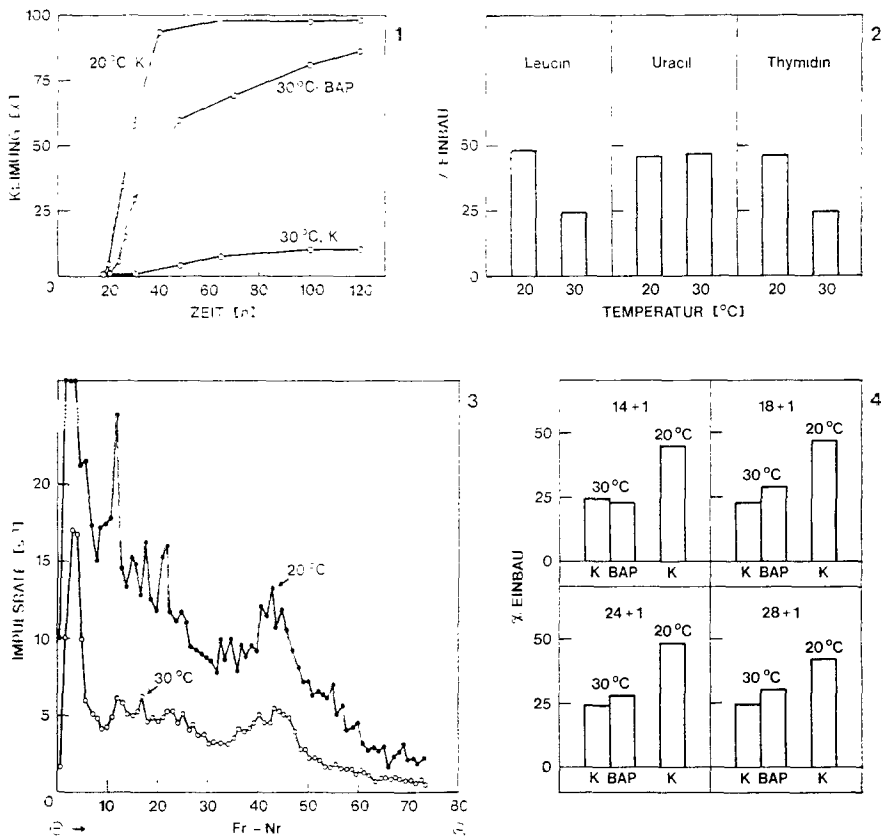


Abbildung 1. Keimungsverlauf aktivierter (20°C; K) und temperaturblockierter (30°C; K) Samen von *Agrostemma githago*. Der Einfluss von Benzylaminopurin auf die Keimung temperaturblockierter Samen (30°C; BAP). — Benzylaminopurin: 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Chemapol).

Abbildung 2. ^{14}C -L-Leucin-, ^3H -Uracil- und ^3H -Thymidin-Einbau in Embryonen aus aktivierten und temperaturblockierten *Agrostemma githago*-Samen. Die Syntheseintensität wurde in % Einbau bezogen auf die Präkursor-Aufnahme angegeben (dabei zeigen blockierte und aktivierte Embryonen nahezu identische Aufnahmezeiten). Die Quellungszeit betrug 18 bzw. 24 h.

Abbildung 3. Disk-Elektrophoretische Trennung der in aktivierten und temperaturblockierten *Agrostemma*-Embryonen synthetisierten Proteine auf Polyacrylamidgelen (pH 8,9; 7,5 %). Elektrophoretische Wanderungsrichtung: von links nach rechts.

Abbildung 4. Einfluss von Benzylaminopurin (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) auf den ^{14}C -L-Leucin-Einbau temperaturblockierter *Agrostemma*-Embryonen. — Angabe der Proteinsynthese in % Einbau bezogen auf die Aufnahme (die Aufnahme des ^{14}C -L-Leucins wird durch Benzylaminopurin nur geringfügig erhöht). Zum Vergleich wurde die Einbauraten aktivierter Embryonen (20°C) angegeben. — Quellungszeiten: 14, 18, 24 und 28 h. — Die Einbauraten stellen Mittelwerte von je 5 Versuchen dar.

-Elektrophorese macht deutlich, dass von der Synthesehemmung nahezu alle Fraktionen und nicht nur einige wenige betroffen sind (Abb. 3).

Die Ursache des stark verminderten ^{14}C -L-Leucin-Einbaus durch temperaturblockierte Embryonen von *Agrostemma githago* ist unbekannt. Zunächst könnte an eine unzureichende Bereitstellung von mRNA gedacht werden. Da ein Teil der mRNA quellender *Agrostemma*-Embryonen über Poly(A)-Sequenzen verfügt (HECKER 1976b, HECKER *et al.* 1976), sollten diese durch Hybridisierung an Oligo(dT)-Cellulose-Säulen gewonnen werden können (vgl. KATES 1973). Die in jüngster Zeit wiederholt beschriebenen Poly(A)-mRNA werden mit dieser Präparationsmethode nicht erfasst (vgl. z.B. NEMER *et al.* 1974). Wir konnten durch mehrere Experimente (einschliesslich der gelelektrophoretischen Trennung der Poly(A)- und Poly(A)⁺-Fraktion) zeigen, dass ausschliesslich Poly(A)-RNA durch Oligo(dT)-Cellulose gebunden wird.

Nach unseren vorläufigen Befunden verlaufen in Embryonen, die aus temperaturblockierten und aus aktivierten, bei 20 °C angequollenen Samen isoliert worden sind, die Synthesen von Poly(A)-RNA mit annähernd gleicher Intensität (Tabelle 3); dabei steht allerdings ein Funktionstest aus, der zeigen müsste, dass Poly(A)-haltige mRNA beider Varianten im *in vitro*-System gleich aktiv sind.

TABELLE 3

Hybridisierung der in temperaturblockierten (30 °C) und aktivierten (20 °C) *Agrostemma*-Embryonen synthetisierten ^3H -Uracil-markierten RNA an Oligo(dT)-Cellulose (Searle Res. Lab., Engl.).

Experimentelle Details vgl. Material und Methoden

	aktiviert	Impulsrate [s^{-1}] blockiert
Gesamt-RNA	393	374
Nicht gebunden		
[Poly(A) ⁻ -Fr.]	356	345
Gebunden		
[Poly(A) ⁺ -Fr.]	36	33
Hybridisierung in %	9,2	8,8

Trotz dieser Einschränkung erlauben unsere Befunde die Schlussfolgerung, dass der Syntheseblock der bei 30 °C angequollenen Samen nicht auf der Transcriptionsebene, sondern entweder im Bereich der posttranscriptionellen Modifikation von RNA (z.B. HnRNA-Processing und Transport in das Cytoplasma, vgl. JOHNSON *et al.* 1975, RNA-Methylierung, jedoch nicht Polyadenylation) oder der Translation zu suchen ist. Damit sind temperaturblockierte Samen von *Agrostemma githago* geeignete Objekte, an denen die Regulation der Genexpression unabhängig von Transcriptionsprozessen studiert werden kann (vgl. auch SCRAGG *et al.* 1975).

Die Temperaturblockierung kann durch Benzylaminopurin, ein synthetisches Cytokinin, überwunden werden (Abb. 1). Dabei zeigen Embryonen aus cytokininbehandelten Samen nur einen geringfügig erhöhten Einbau markierten Leucins in Protein (Abb. 4). Ähnliche Befunde wurden auch bei Inkubation der Embryonen mit ^{14}C -L-Leucin niedriger spezifischer Aktivität erhalten.

Diskussion

Über Wirkungen der Cytokinine auf pflanzliche Protein- und Enzymsynthesen liegen umfangreiche Untersuchungen vor (vgl. BORRISS 1967, PENNER und ASHTON 1967, SKOOG und ARMSTRONG 1970, HIRSCHBERG *et al.* 1972, KARAVAIKO *et al.* 1975). Neben spezifischen Enzyminduktionen (HIRSCHBERG *et al.* 1972) wurden auch Stimulationen der *in vivo* (KNYPL 1970) und *in vitro* (KULAEVA 1974) gemessenen Proteinsynthesen beschrieben. Neuere Untersuchungen lassen dabei deutlich werden, dass Cytokinine in vielfältiger Weise in die Translationsprozesse einzugreifen vermögen, beispielsweise über die Initiationsfaktoren (RIJVEN 1974), möglicherweise auch über ihren Einbau in tRNA bzw. über eine Beeinflussung der Aminoacylierung und Methylierung isoakzeptierender tRNA (Übersicht bei KAMÍNEK 1975). Wiederholt wurden Cytokininrezeptoren in Pflanzenribosomen beobachtet (FOX und ERION 1975, GARDNER *et al.* 1975), die mit der positiven Wirkung der Cytokinine auf die Proteinsynthese im Zusammenhang stehen könnten (KLÄMBT 1975).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass temperaturblockierte Samen von *Agrostemma githago* durch eine stark verminderte Protein-, aber unverminderte RNA-Synthese gekennzeichnet sind. Dabei werden nicht nur rRNA und tRNA, sondern auch Poly(A)-RNA (wahrscheinlich mRNA) in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt, wobei ein Teil der in temperaturblockierten Embryonen synthetisierten mRNA möglicherweise nicht zur Translation gelangt.

Cytokinine (Benzylaminopurin) sind in der Lage, die Entwicklungshemmung der Samen zu durchbrechen. Dabei galt es zu prüfen, ob neben der Samenruhe auch der Translationsblock aufgehoben wird, was eine drastische Stimulation der Proteinbiosynthese durch Cytokinine bedeuten würde. Diese Annahme erschien uns nicht unbegründet, zumal bekannt ist, dass verschiedene Enzyme auch in den Embryonen von *Agrostemma githago* durch Cytokinine zu induzieren sind (vgl. BORRISS 1967, BORRISS *et al.* 1972).

In den mit Cytokinen gefütterten Embryonen wurde nur eine geringe Zunahme des ^{14}C -L-Leucin-Einbaus gemessen. Möglicherweise ist die Synthese nur weniger Proteine an der Überwindung der temperaturbedingten Entwicklungshemmung beteiligt.

Literatur

- BORRISS, H.: Über einige Ergebnisse und Probleme der Keimungsphysiologie. — Wiss. Z. Univ. Greifswald, Math.-Nat. Reihe **6** : 251—265, 1956.
- BORRISS, H.: Untersuchungen über die Steuerung der Enzymaktivität in pflanzlichen Embryonen durch Cytokine. — Wiss. Z. Univ. Rostock **16** : 629—639, 1967.
- BORRISS, H., SCHULZE, J., GALLIEN, R., ALBRECHT, E.: Über qualitative und quantitative Veränderungen der Fermentgarntur während der Reifungs- und Keimungsvorgänge von *Agrostemma*-Samen. — In: BORRISS, H. (ed.) Int. Symp. Physiol., Ökol. u. Biochemie d. Keimung. Pp. 697—717. Greifswald 1967.
- BORRISS, H., SCHMERDER, B., GIUC, P. H.: Die Wirkung von Phytohormonen und Inhibitoren auf die Enzymaktivität dormanter und nachgereifter *Agrostemma*-Embryonen. — Abstr. Symp. Natural Plant Growth Subst., Liblice 1972.
- FOX, J. E., ERION, J. L.: Cytokinin binding protein from higher plant ribosomes. — Biochem. biophys. Res. Commun. **64** : 694—700, 1975.
- GARDNER, G., SUSSMAN, M. R., KENDE, H.: Cytokinin binding to particulate fractions from moss. — Plant Physiol. **56** (suppl.) : 28, 1975.

- HECKER, M.: Untersuchungen über die Protein-, RNS- und DNS-Synthese in gealterten Samen von *Agrostemma githago* L. unterschiedlicher Keimungsbereitschaft. — Biol. Rundschau **12** : 277—279, 1974a.
- HECKER, M.: RNS-Synthese in dormanten und nachgereiften *Agrostemma githago*-Samen — RNS-Methylierung und Affinität der RNS zu Poly(U)-Filterscheiben. — Biochem. Physiol. Pflanzen **166** : 461—467, 1974b.
- HECKER, M.: Der Einfluss von Licht verschiedener Wellenlängen auf die DNA-, RNA- und Proteinbiosynthesen in blockierten und aktivierten Embryonen von *Agrostemma githago*. — Biol. Rundschau **13** : 232—234, 1975.
- HECKER, M.: Untersuchungen über Nucleinsäuren- und Proteinbiosynthesen während der Embryoentwicklung von *Agrostemma githago*. — Biol. Zentralbl. **95** : 25—33, 1976a.
- HECKER, M.: Untersuchungen über stabile und während der frühen Quellungsstadien neu synthetisierte Poly(A)-RNA von *Agrostemma*-Samen. — Experientia **32** : 50—53, 1976.
- HECKER, M., WIEDMANN, M., KÖHLER, K.-H., SERFLING, E.: Untersuchungen über den Start der RNA- und Proteinbiosynthesen quellender *Agrostemma githago*-Embryonen. — Biochem. Physiol. Pflanzen **169** : 427—436, 1976.
- HIRSCHBERG, K., HÜBNER, G., BORRIS, H.: Cytokinin-induzierte *de novo*-Synthese der Nitrat-reduktase in Embryonen von *Agrostemma githago*. — Planta **108** : 333—337, 1972.
- JOHNSON, L. F., WILLIAMS, J. G., ABELSON, H. T., GREEN, H., PENMAN, S.: Changes in RNA in relation to growth of the fibroblast. III. Posttranscriptional regulation of mRNA formation in resting and growing cells. — Cell **4** : 69—75, 1975.
- KAMÍNEK, M.: Die Cytokine und ihre Beziehungen zu den Transfer-Ribonukleinsäuren. — Biol. Rundschau **13** : 137—152, 1975.
- KARAVAIKO, N. N., OHMANN, E. E., KULAEVA, O. N.: [Effect of cytokinin on enzyme activity in isolated pumpkin cotyledon.] Russ. — Fiziol. Rast. **22** : 1031—1038, 1975.
- KATES, J.: Detection and utilization of poly(A) sequences in messenger RNA. In: Methods in Cell Biology. Vol. VII. Pp. 53—65. Acad. Press, New York—London 1973.
- KHAN, A. A.: Cytokinins: Permissive role in seed germination. — Science **171** : 853—859, 1971.
- KLÄMBT, D.: On the regulation of cell metabolism by auxin and cytokinin. — Abstr. XII intern. bot. Congress, P. 297. Nauka, Leningrad 1975.
- KNYPL, J. S.: Complementary action of potassium and benzylaminopurine on growth, chlorophyll, protein and RNA synthesis in cucumber cotyledons. — Current Sci. **39** : 534—535, 1970.
- KULAEVA, O. N.: Effect of cytokinin on RNA and protein synthesis in plants. — In: Biochemistry and Chemistry of Plant Growth Regulators. (Proc. Intern. Symp.) Pp. 259—275. Cottbus 1974.
- MATSUMURA, R., NODA, H.: A simple device for transverse slicing of polyacrylamide gel rods. — Anal. Biochem. **56** : 571—575, 1973.
- NEMER, M., GRAHAM, M., DUBROFF, L. M.: Co-existence of non-histone messenger RNA species lacking and containing polyadenylic acid in sea urchin embryos. — J. mol. Biol. **89** : 435 bis 454, 1974.
- PENNER, D., ASHTON, F. M.: Hormonal control of proteinase activity in squash cotyledons. — Plant Physiol. **42** : 791—796, 1967.
- RJIVEN, A. H. G. C.: Initiation of polyphenylalanine synthesis and the action of cytokinins in fenugreek cotyledons. — Nature **252** : 257—259, 1974.
- SCRAGG, A. H., JOHN, P. C. L., THURSTON, C. F.: Post-transcription control of isocitrate lyase induction in the eukaryotic alga *Chlorella fusca*. — Nature **257** : 498—501, 1975.
- SKOOG, F., ARMSTRONG, D. J.: Cytokinins. — Annu. Rev. Plant Physiol. **21** : 359—384, 1970.
- WAREING, P. F., SAUNDERS, P. F.: Hormones and dormancy. — Annu. Rev. Plant Physiol. **22** : 261—288, 1971.