

JANINA PRZYBYLSKA

Zakład Genetyki Roślin PAN w Poznaniu

Zapiec

1.3,

## ELEKTROFORETYCZNA ANALIZA BIAŁEK JAKO METODA EKSPERYMENTALNEJ TAKSONOMII ROŚLIN

### Wstęp

W zakres eksperymentalnej taksonomii roślin — jak podaje Müntzing (1969) — wchodzi ustalanie występowania i charakteru takich różnic wewnątrz i międzygatunkowych, których nie da się określić i wyjaśnić przy pomocy metod jakimi dysponuje morfologia, ekologia i geografia roślin.

Rozwój eksperymentalnej taksonomii uwarunkowany jest ściśle wprowadzaniem nowych technik analizowania cech. Z reguły techniki te opracowywane są nie przez taksonomistów, ale przez specjalistów innych dziedzin — cytologów, biochemików, chemików, fizyków i matematyków. Stąd wynikają liczne powiązania taksonomii z pokrewnymi oraz odległymi dziedzinami nauki.

Nowoczesna taksonomia w dużej mierze opiera się na danych eksperymentalnych. Dzięki temu współczesny taksonomista nie ogranicza się do opisywania, definiowania i klasyfikowania jednostek taksonomicznych, ale przyczynia się również do wyjaśniania zmienności organizmów i poznawania mechanizmów prowadzących do tej zmienności. Dlatego — jak podkreśla Müntzing (1969) — ogólnie się dzisiaj docenia wzajemne korzyści współpracy taksonomistów i genetyków.

Jakkolwiek koncepcja zastosowania danych analizy chemicznej w badaniach taksonomicznych roślin jest dawna, to jednak dopiero ostatnie lata przyniosły żywiołowy rozwój chemotaksonomii. Świadczy o tym, między innymi, pojawienie się w ostatnim czasie kilku obszernych opracowań książkowych dotyczących badań chemotaksonomicznych (Alston i Turner 1963; Hawkes 1968; Hegnauer 1962—65; Heywood 1968, Leone 1964; Swain 1963, 1966).

Rozwój chemotaksonomii wiąże się z postępami w dziedzinie biochemii i chemii organicznej, a także z opracowywaniem stosunkowo prostych i tanich metod analitycznych. Początkowo zainteresowania taksonomistów koncentrowały się głównie wokół związków niskocząsteczkowych jak alkaloidy, substancje cyjanogenne, fenole, flawonoidy, terpenoidy, niebiałkowe aminokwasy itp., co w dużej mierze było konsekwencją wprowadze-

nia różnych technik chromatograficznych umożliwiających dokonanie szybkiego przeglądu tych związków. Z wyjątkiem danych serologicznych, charakterystyka makrocząsteczek nie odegrała większej roli w badaniach taksonomicznych. Trudności techniczne ograniczają jednak stosowanie metod serologicznych w taksonomii. Szerokie wykorzystanie charakterystyki kompleksów białkowych w badaniach taksonomicznych zyskało realne podstawy dopiero z chwilą opracowania odpowiednich wariantów analizy elektroforetycznej, a szczególnie elektroforezy na żelu skrobiowym i poliakrylamidowym.

Przedmiotem niniejszego artykułu jest uzasadnienie celowości porównawczej analizy białek w badaniach taksonomicznych oraz scharakteryzowanie i krytyczne omówienie analizy elektroforetycznej jako metody eksperymentalnej taksonomii. Ponadto, na szeregu przykładach ilustruje się dotychczasowe zastosowania elektroforetycznej analizy białek w badaniach taksonomicznych roślin.

Należy zaznaczyć, że przydatność elektroforetycznej analizy białek w badaniach taksonomicznych roślin dyskutowana była ostatnio w licznych zagranicznych artykułach referatowych, co świadczy o dużej aktualności tego tematu (Boulter, Thurman 1968; Boulter, Thurman, Turner 1966; Fairbrothers 1968, 1969; Johnson 1970; Steward, Barber 1964; Vaughan 1968a, 1968b).

### *Znaczenie porównawczej analizy białek w badaniach taksonomicznych*

Podstawowym kryterium pokrewieństwa genomów jest homologia genów. Nie zawsze jest jednak możliwe bezpośrednio określenie homologii genów metodami eksperymentalnej genetyki. Przy porównywaniu jednostek taksonomicznych na poziomie gatunku, lub wyżej, metody genetyczne zawodzą z uwagi na bariery reprodukcji.

Wycenę homologii genów można, w wielu przypadkach, przeprowadzić na podstawie homologii białek. Badania nad strukturą i biologiczną aktywnością genów wykazały ściśle powiązanie między genem a białkiem. Kolejność ułożenia aminokwasów w łańcuchach polipeptydowych, czyli pierwszorzędowa struktura białka determinująca jego cechy, odzwierciedla liniową sekwencję kodujących jednostek nukleotydowych genu. Wynika stąd, że analiza homologicznych polipeptydów może być źródłem cennych informacji dotyczących pokrewieństwa genomów i ewolucyjnej przeszłości (Anfinsen 1960; Pauling, Zuckerkandl 1963; Zuckerkandl, Pauling 1965).

W badaniach taksonomicznych analizuje się zarówno białka zapasowe jak i białka enzymatyczne. Johnson i Thein (1970) wyrażają przypuszczenie, że zapasowe białka nasion stanowią szczególnie cenny materiał do ba-

dań filogenetycznych, gdyż w tej grupie białek organizm toleruje „akumulację” zmian mutacyjnych. Wydaje się jednak, że analiza izoenzymów — zwanych w niniejszym artykule również układami enzymatycznymi — ma także dużą przyszłość w rozwiązywaniu problemów taksonomii. Ponieważ badania te należą do najnowszych dziedzin taksonomii, celowe jest wyjaśnienie terminu *izoenzym*.

Terminem *izoenzymy*\* określa się molekularnie różne formy enzymu wykazujące ten sam typ aktywności katalitycznej. Występowanie u tego samego gatunku, w obrębie organizmu, a nawet w określonej tkance, wielorakich (multiple) form enzymu jest obecnie dobrze udokumentowane (Shannon 1968; Shaw 1965; Skangiel-Kramaska 1969).

Istnienie w obrębie gatunku izoenzymowych form enzymu tłumaczy się występowaniem w procesie ewolucji gatunku mutacji prowadzących do takich zmian w strukturze białka enzymatycznego, które nie mają wpływu na aktywność enzymatyczną. Liczba występujących w organizmie izoenzymów zwielokrotnia się z uwagi na fakt, że szereg enzymów posiada tak zwaną strukturę czwartorzędową, to znaczy składa się z dwóch, lub więcej, polipeptydowych podjednostek. Przy strukturalnym zróżnicowaniu podjednostek i losowej ich asocjacji teoretyczną liczbę izoenzymów można obliczyć według wzoru przytoczonego przez Shannona (1968):

$$i = \frac{(S + P - 1)!}{P! (S - 1)!}$$

$i$  = liczba izoenzymów,

$P$  = liczba podjednostek,

$S$  = liczba różnych typów podjednostek.

Jakkolwiek izoenzymy wykazują taką samą specyficzność enzymatyczną, mogą się jednak różnić szeregiem właściwości katalitycznych, jak np. powinowactwo względem substratu, wrażliwość względem inhibitora, optimum pH, termostabilność, specyficzna aktywność. Z ewolucyjnego punktu widzenia występowanie izoenzymów jest cechą korzystną dla organizmu, gdyż chroni go przed utratą funkcji w wyniku mutacji lub stressów środowiska. W przypadku organizmów zapładniających się krzyżowo głównym źródłem polimorfizmu jest zmienność alleliczna. U organizmów samozapładniających się, jak rośliny samopylne, duże znaczenie ma polimorfizm wynikający z duplikacji genów (Sing, Brewer 1969). Analiza obu typów polimorfizmu może oddać usługi w badaniach ewolucyjnych.

\*: Markert i Moller (1959) wprowadzili termin *izoenzymy* dla określenia różnych form molekularnych, w jakich mogą występować białka o tej samej specyficzności enzymatycznej. Termin „izoenzymy” uznano za równocenny (Skangiel-Kramaska 1969).

### *Metody porównawczej analizy białek*

• Wśród podstawowych metod stosowanych obecnie w badaniach porównawczych białek można wyróżnić metody określające cechy strukturalne białek oraz metody charakteryzujące ich właściwości fizykochemiczne i biologiczne. Do pierwszej grupy należy zaliczyć: zaznaczanie składu aminokwasowego, metodę o d c i s k ó w p a l c ó w (fingerprinting) polegającą na analizie peptydów częściowo zhydrolizowanego białka przy pomocy dwukierunkowej kombinacji elektroforezy i chromatografii bibułowej (Ingram 1958) oraz usatlnianie sekwencji aminokwasów. Z metod drugiej grupy wymienić należy: oznaczanie ciężarów cząsteczkowych, analizę elektroforetyczną, chromatograficzną, serologiczną oraz oznaczanie aktywności katalitycznej.

Spośród wymienionych wyżej metod najwięcej informacji o chemicznym pokrewieństwie białek dostarcza analiza sekwencji aminokwasów. Oznaczanie kolejności aminokwasów w łańcuchach polipeptydowych jest jednak kosztowne, pracochłonne, wymaga precyzyjnej aparatury, a ponadto nie jest praktycznie wykonalne w odniesieniu do wszystkich typów białek. Jest zatem oczywiste, że metoda ta nie nadaje się do seryjnych analiz. Pozostałe metody różnią się pod względem niezbędnego nakładu pracy i kosztów, a wartość dostarczanych przez nie danych jest sprawą dyskusyjną i względną, gdyż wymaga rozpatrzenia w nawiązaniu do rozwiązywanego problemu. W seryjnych badaniach porównawczych określonych frakcji białkowych duże usługi może oddać nieskomplikowana a dostarczająca wiele informacji metoda *f i n g e r p r i n t u*. Niewątpliwie jest jednak, że charakterystyka białek przeprowadzona w oparciu o ich ruchliwość elektroforetyczną jest metodą najszybszą, najprostszą i chyba najtańszą. Dzięki wprowadzonym ostatnio udoskonaleniom technicznym, a szczególnie dzięki zastosowaniu odpowiednich typów żelu jako środowiska, w którym następuje rozdział, metoda elektroforezy białek wykazuje bardzo dużą siłę rozdzielczą i umożliwia wnikliwe porównanie skomplikowanych mieszanin białkowych.

### *Techniki elektroforetycznej analizy białek*

Elektroforezę można zdefiniować jako wędrówkę obdarzonych ładunkiem cząsteczek pod działaniem pola elektrycznego. Zjawisko to jest powszechnie wykorzystywane jako podstawa metody rozdzielania związków różniących się ilością i ładunkiem grup jonizujących. Do związków takich należą również białka, które są jonami wielowartościowymi. Całkowity ładunek cząsteczki białka jest, w określonych warunkach środowiska, wielkością charakterystyczną dla danego typu białka.

Ruchliwość elektroforetyczna, czyli szybkość poruszania się obdarzonych ładunkiem cząsteczek w polu elektrycznym, zależy od wielu czynni-



ków. Do najważniejszych należą: ładunek i kształt cząsteczek, niektóre właściwości otaczającego środowiska (skład chemiczny, siła jonowa, lepkość, pH) oraz wielkość przyłożonego pola elektrycznego.

Rozróżnia się elektroforezę swobodną, czyli częściowe rozdzielenie mieszaniny w roztworze oraz elektroforezę pasmową, to jest całkowite rozdzielenie wąskiego pasma mieszaniny na składniki o różnej ruchliwości elektroforetycznej. Elektroforezę pasmową przeprowadza się najczęściej na porowatych nośnikach, co zapobiega konwekcji. Jako nośniki stosowane są bibuła filtracyjna oraz różnego typu żele (Ostrowski 1970).

Rewelacyjne osiągnięcia w udoskonalaniu techniki elektroforetycznego rozdziału mieszanin białkowych uzyskano dzięki wprowadzeniu jako nośnika dwóch typów żelu, żelu skrobiowego i żelu poliakrylamidowego. Zasadniczą cechą odróżniającą elektroforezę na wymienionych typach żelu od innych technik elektroforetycznych jest efekt *sita* lub inaczej *sączenia molekularnego*, opisany po raz pierwszy przez Smithiesa (1955) dla żelu skrobiowego. Gęsta sieć przestrzenna żelu działa jako swoje *sito hamujące* ruch cząsteczek białkowych tym silniej im są one większe. Rozdział białek zachodzi zatem pod wpływem działania pola elektrycznego oraz w wyniku „przesiewania” cząsteczek przez *sito molekularne*.

Stopień zróżnicowania siły rozdzielczej elektroforezy bibułowej i elektroforezy na żelu skrobiowym można zilustrować na przykładzie rozdziału białek surowicy ludzkiej; techniką elektroforezy bibułowej wydzielano z reguły 5 do 7 frakcji, a przy pomocy elektroforezy na żelu skrobiowym Smithies (1959) wyodrębnił ponad 30 frakcji.

Zastosowanie żelu poliakrylamidowego, zamiast żelu skrobiowego, jako nośnika przy elektroforetycznej analizie białek, wprowadzili jako pierwsi Davis i Ornstein (1959) oraz, niezależnie Raymond i Weintraub (1959). Żel poliakrylamidowy jest syntetycznym polimerem otrzymywanym z niskocząsteczkowych związków chemicznych dużej czystości. W stosunku do żelu skrobiowego żel poliakrylamidowy wykazuje liczne zalety (Ornstein 1964; Davis 1964). Jest termostabilny, bardziej odporny mechanicznie i stosunkowo obojętny chemicznie (skrobia ulega rozkładowi przez enzymy amylolityczne). Akrylamid nie zawiera, względnie zawiera niewiele, bocznych grup jonowych, podczas gdy skrobia wykazuje obecność grup anionowych, które są częściowo odpowiedzialne za wsteczny endosmotyczny przepływ. Ważną zaletą żelu poliakrylamidowego jest możliwość uzyskiwania dużego zakresu średniej wielkości porów (przez odpowiednie stężenie monomeru), co pozwala w pełni wykorzystać efekt *sita molekularnego*. Dodatkłą cechą żelu poliakrylamidowego jest również jego przezroczystość umożliwiająca densytometryczną rejestrację rozdzielonych i wybarwionych frakcji białkowych. Należy też wspomnieć, że przygotowanie żelu poliakrylamidowego jest technicznie proste.

Od chwili wprowadzenia żelu poliakrylamidowego opracowano liczne warianty analizy elektroforetycznej białek przy zastosowaniu tego nośnika (Gordon 1969; Ostrowski 1970). W badaniach taksonomicznych szczególnie szerokie zastosowanie znalazła elektroforeza dyskowa opracowana przez Ornsteina i Davisa (1962).

Zasadniczym momentem w technice elektroforezy dyskowej jest elektroforetyczne zagęszczanie próby jonów przed właściwym rozdziałem elektroforetycznym. Zredukowanie grubości próby w strefie startowej pozwala na znaczne skrócenie czasu elektroforetycznego rozdziału składników mieszaniny, dzięki czemu ogranicza się do minimum zjawisko dyfuzji i uzyskuje ostrzejszy rozdział.

Elektroforezę dyskową przeprowadza się na małych kolumnkach żelu. Mechanizm automatycznego zagęszczenia analizowanej mieszaniny białkowej opisany został szczegółowo przez Ornsteina (1964) w artykule omawiającym teoretyczną stronę tej metody. Istotne znaczenie w doborze warunków ma nieciągłość, *d i s c o n t i n u i t y*, matrycy elektroforetycznej. Nazwa *disc electrophoresis* tłumaczona jako elektroforeza dyskowa pochodzi zarówno od słowa *discontinuity*, jak i od przymiotnika *discoid*, który określa krążkowy kształt wydzielonych na kolumnkach żelu stref białka (Ornstein 1964).

Szczegółowe dane metodyczne dotyczące elektroforezy dyskowej znaleźć można w obszernym artykule Davisa (1964) przedstawiającym opis aparatury i tok analizy. Należy jeszcze zwrócić uwagę na prace Reisfelda i wsp. (1962) oraz Williamsa i Reisfelda (1964), którzy do metody Ornsteina i Davisa wprowadzili kwaśny system buforujący umożliwiający lepszy rozdział białek zasadowych.

Technika elektroforezy dyskowej pozwala analizować małe próby białka, rzędu 50—200  $\mu\text{g}$ . Warto wspomnieć, że przy mikromodyfikacjach tej metody (Grossbach 1965; Hyden, Bjurstam, McEven 1966) można dokonać analizy białek rozpuszczalnych na poziomie komórki.

Elektroforeza dyskowa charakteryzuje się bardzo dużą siłą rozdzielczą. Chang i wsp. (1962) porównali elektroforetyczne rozdziały rozpuszczalnych białek *Neurospora*, stosując różne techniki analizy elektroforetycznej. Przy pomocy elektroforezy bibułowej wydzielano 6—8 frakcji, elektroforeza na żelu skrobiowym pozwoliła wydzielić 18 frakcji, a elektroforeza dyskowa — 25 frakcji.

Szerokie zastosowanie elektroforezy dyskowej w badaniach taksonomicznych tłumaczy się faktem, że technika ta spełnia warunki stawiane metodzie seryjnej analizy; jest technicznie prosta, nie wymaga skomplikowanej aparatury ani kosztownych odczynników, a ponadto umożliwia stosunkowo szybkie wykonanie dużej serii analiz.

Technika elektroforezy na żelu, najczęściej skrobiowym lub poliakry-

lamidowym, w połączeniu z histochemicznymi metodami wykrywania aktywności enzymatycznych, nosi nazwę techniki zymogramów i umożliwia selektywne wykrywanie białek o określonej aktywności enzymatycznej (Hunter, Markert 1957). Jak podkreślają liczni autorzy, metoda elektroforetyczna jest podstawową metodą analityczną w badaniach izoenzymów. Pozwala ona szybko wykrywać elektroforetyczne warianty enzymów, czyli takie formy enzymów, w których zmiany genetyczne ujawniają się w zmianie ruchliwości elektroforetycznej (Baranowski 1970; Shannon 1968, Shaw 1965).

### *Reproduktywność wyników elektroforetycznej analizy białek roślinnych*

Metody analityczne stosowane w badaniach porównawczych powinny zapewniać dużą reproduktywność wyników. Jak stwierdzono w licznych laboratoriach, elektroforetyczne obrazy białkowe, uzyskane techniką elektroforezy dyskowej, są wysoce odtwarzalne pod warunkiem ścisłego przestrzegania określonego toku postępowania analitycznego.

W trakcie ekstrakcji białek, przechowywania ekstraktów oraz rozdziału elektroforetycznego zachodzić mogą procesy prowadzące do tworzenia artefaktowych prążków na elektroferogramach. Należy brać pod uwagę możliwość wystąpienia takich zjawisk jak: dysocjacja cząsteczek białkowych na składowe podjednostki, asocjacja podjednostek do dużych agregatów białkowych, interakcja białko-białko, względnie białko-składniki buforu (Catsimpoolas 1970; Ewart 1966; Grant, Lawrence 1964; Parker i Bearn 1963; Przybylska, Hurich 1971a). Rodzaj i natężenie procesów odpowiedzialnych za zmiany natywnego białka zależą od licznych czynników określających warunki poszczególnych etapów analizy. Szczególnie ważne jest kontrolowanie takich czynników jak pH buforu ekstrahującego, stosunek ilościowy środka ekstrahującego do materiału roślinnego i temperatura w jakiej przeprowadza się poszczególne etapy analizy. W przypadku przechowywania ekstraktu w stanie zamrożenia wskazane jest rozdzielanie go na kilka porcji w celu uniknięcia kilkakrotnego rozmrażania przy wykonywaniu powtórnych analiz.

### *Porównywanie i interpretacja elektroforetycznych obrazów białkowych*

W badaniach porównawczych białek istotne znaczenie ma analizowanie porównywalnych organów w możliwie ściśle określonych fazach rozwoju. Nieprzestrzeganie tego podstawowego warunku prowadzić może do błędnych wniosków, gdyż skład białek w roślinie różni się w zależności od organu i zmienia w trakcie wzrostu i rozwoju roślin (Steward, Lyndon, Barber 1965; Barber, Steward 1968).

W badaniach chemotaksonomicznych roślin analizuje się najczęściej białka nasion. Wybór ten podyktowany jest szeregiem względów. Przede



wszystkim jednak należy podkreślić, że nasiona w stanie spoczynku stanowią materiał stosunkowo porównywalny. Istotne jest również, że czynniki środowiska w stosunkowo niewielkim stopniu wpływają na skład białek nasion; analiza elektroforetyczna nie wykazywała na ogół różnic związanych z warunkami rozwoju roślin (Larsen 1967; Hynes 1968; Przybylska, Hurich 1971b).

Porównywalność elektroforetycznych obrazów białkowych, podobnie jak ich reproduktywność, jest oczywiście uwarunkowana ujednoczeniem stosowanych metod. Analizując białka różnych jednostek taksonomicznych, szczególnie odległych, trzeba jednak pamiętać, że istnieje możliwość niekontrolowanego zróżnicowania warunków eksperymentalnych; nie można wykluczyć, że badane taksony zawierają odrębne związki, które przechodzą do ekstraktów białkowych i oddziałują w specyficzny sposób na kompleksy białkowe.

W elektroforetycznych, porównawczych, badaniach białek celowe jest równoległe analizowanie różnych frakcji białkowych oraz stosowanie różnych wariantów analizy, szczególnie różnych układów buforujących. Poszerzona analiza elektroforetyczna dostarcza uzupełniające się informacje o badanych taksonach i umożliwia wnikliwsze ich różnicowanie (Desborough, Peloquin 1966, 1969; Przybylska, Hurich 1971a, 1971b).

Porównując elektroforetyczne obrazy białkowe bierze się pod uwagę pozycje poszczególnych prążków reprezentujących wydzielone frakcje białkowe. Na elektroferogramach żelowych, uzyskanych techniką elektroforezy dyskowej, pozycję każdego prążka określa się wartością  $R_p$ , czyli względną drogą przebytą przez dane białko w stosunku do drogi przebytej przez standard (szybko poruszający się wskaźnik) i przyjętej za jednostkę. W przypadku, gdy rozdział elektroforetyczny porównywanych mieszanin odbył się na różnych drogach, konieczne jest sprowadzenie dróg elektroforetycznych do tej samej długości techniką fotograficzną, densytometryczną lub przez wykonanie diagramów. Bardzo pomocne przy ustalaniu homologii prążków jest równoczesne analizowanie porównywanych ekstraktów białkowych oraz ich mieszanin (Johnson, Barnhart, Hall 1967).

W oparciu o elektroforetyczne obrazy białkowe obliczać można procentowe pokrewieństwo między porównywanymi jednostkami systematycznymi. Obliczenie według Whitney'ego i wsp. (1968) przeprowadza się w następujący sposób:

$$\frac{\text{liczba prążków podobnych}}{\text{liczba różnych prążków} + \text{liczba par prążków podobnych}}$$

Porównując ekstrakty białkowe metodą elektroforetyczną należy pamiętać, że jest to pośrednia metoda oceny pokrewieństwa białek i że uzyskane wyniki winny być niterpretowane z dużą dozą ostrożności. Iden-



tyczne obrazy elektroforetyczne porównywanych mieszanin białkowych nie świadczą, że mieszaniny te są identyczne. Pozycja białka na elektroferogramie żelu skrobiowego lub poliakrylamidowego zależy od ładunku elektrycznego warunkowanego składem aminokwasowym oraz od wielkości i kształtu cząsteczki białkowej. Wynika stąd, że różne białka mogą wędrować z tą samą szybkością. Po pierwsze, białka o różnym składzie aminokwasowym mogą mieć taki sam ładunek elektryczny, a po drugie, białka różniące się ładunkiem mogą wykazywać taką samą ruchliwość elektroforetyczną, gdy różnice w ładunku kompensowane są różnicami w wielkości i kształcie cząsteczki. Jest jednak wysoce prawdopodobne, że w przypadku blisko spokrewnionych jednostek systematycznych prążki białkowe o tych samych wartościach  $R_p$  i tej samej morfologii reprezentują homologiczne białka.

Prawdopodobieństwo ustalania homologii frakcji białkowych porównywanych mieszanin jest znacznie zwiększone, gdy technikę elektroforezy na żelu skrobiowym lub poliakrylamidowym połączy się z techniką selektywnego wykrywania białek o podobnych właściwościach enzymatycznych.

#### *Przykłady zastosowania elektroforetycznej analizy białek w badaniach taksonomicznych*

##### Porównywanie jednostek systematycznych na różnym poziomie taksonomicznym

Jak wynika z przytoczonych niżej przykładów, elektroforetyczna analiza białek okazała się przydatna do charakteryzowania jednostek systematycznych na różnym poziomie taksonomicznym.

Fox i wsp. (1964) porównując białka albuminowe nasion szeregu gatunków należących do *Leguminosae* wykazali, że elektroforetyczne obrazy białkowe gatunków tego samego rodzaju są bardziej podobne niż gatunków reprezentujących różne rodzaje. Boulter i wsp. (1967) analizowali globuliny nasion znacznej liczby gatunków roślin motylkowych i stwierdzili, że elektroforetyczne schematy białkowe są charakterystyczne dla plemion, a w niektórych przypadkach również dla rodzajów. W badaniach porównawczych roślin motylkowych zastosowanie znalazła również technika zymogramów; Thurman i wsp. (1967) wykazali, że istnieje wyraźna korelacja między obrazami elektroforetycznymi frakcji globulinowych a zymogramami dehydrogenazy kwasu mrówkowego. Warto wspomnieć, że analiza frakcji globulinowych roślin motylkowych, przeprowadzona metodą *fingerprintu* (Jackson, Milton, Boulter 1967) dostarczyła dane zgodne z wynikami badań elektroforetycznych.

Dane elektroforetyczne, uzyskane dla białek albuminowych i globulinowych nasion, wykazały wyraźne zróżnicowanie szeregu gatunków *Medi-*

icago (Przybylska, Hurich 1971b). Spośród 12 badanych gatunków szczególnie wyodrębniła się *M. lupulina*, której elektroforetyczne obrazy białkowe zbliżone były do obrazów *Trifolium* i *Melilotus*. Należy zaznaczyć, że zróżnicowanie badanych gatunków *Medicago* w oparciu o elektroforetyczne schematy białek korelowało z ich klasyfikacją opartą o cechy morfologiczne. Trzeba też podkreślić, że uzyskane dane wykazały dużą zgodność z wynikami badań Simona (1969), który białka nasion różnych gatunków *Medicago* oraz pokrewnych rodzajów analizował metodami serologicznymi.

Vaughan i wsp. (1965, 1966) porównywali rozpuszczalne białka nasion 3 gatunków *Brassica*: *B. campestris*, *B. oleracea* i *B. nigra*, stosując metody serologiczne oraz technikę elektroforezy dyskowej. W oparciu o obydwa rodzaje analiz wykazano wyraźne różnice międzygatunkowe stwierdzając równocześnie większe podobieństwo między *B. campestris* i *B. oleracea*, niż między którymkolwiek z tych gatunków a *B. nigra*. Powyższe wyniki potwierdzały słuszność klasyfikacji opartej o cechy morfologiczne i dane cytologiczne. Badania elektroforetyczne wykazały ponadto, że z dwóch pokrewnych sobie gatunków, *B. campestris* i *B. oleracea*, *B. campestris* wykazuje większe podobieństwo do *B. nigra*. Obserwacja ta nie znalazła poparcia w analizie serologicznej. O ile informacja uzyskana przy pomocy elektroforezy potwierdzona będzie danymi z innych dyscyplin — piszą autorzy omawiając wyniki — słuszne będzie uważać, że technika elektroforezy dyskowej dostarczyła wartościowszych danych niż metody serologiczne. Interesujące jest, że w późniejszych badaniach, w których zastosowano technikę zymogramów, schematy prążków wykazujących aktywność  $\beta$ -glukozydazy również sugerowały, że *B. nigra* i *B. campestris* są sobie bliższe, niż *B. nigra* i *B. oleracea* (Vaughan, Waite 1967a).

Analiza elektroforetyczna białek okazała się przydatna w określaniu stosunków pokrewieństwa gatunków *Solanum*. Desborough i Peloquin (1966, 1969) uzyskiwali charakterystyczne dla gatunków obrazy elektroforetyczne białek bulw; zdaniem autorów mogą być one wykorzystywane w analizie genetycznej i jako kryteria taksonomiczne.

Zróżnicowanie elektroforetycznych obrazów białek stwierdzano również na poziomie odmian uprawnych. Silano i wsp. (1969) zaobserwowali różnice międzyodmianowe w obrazach elektroforetycznych albumin i globulin ziarna w obrębie *Triticum aestivum* i *T. durum*. Larsen (1967), w wyniku elektroforetycznej analizy białek nasion 61 odmian soi (*Glycine max* L. Merrill), wykazał obecność dwóch składników, których występowanie było podstawą podziału badanych odmian na dwie grupy. Hynes (1968) analizował elektroforetycznie zapasowe białka nasion 22 odmian *Pisum sativum*, przy czym zaobserwował 3 typy schematów białkowych charakterystyczne dla odmian. Analiza mieszańców uzyskanych ze skrzyżowania odmian różniących się obrazem elektroforetycznym wykazała, że elektro-

foretyczne warianty białek zapasowych kontrolowane są przez trzy geny alleliczne.

### B a d a n i a   n a d   m i e s z a ń c a m i

Elektroforetyczna analiza białek nasion znalazła szerokie zastosowanie w badaniach nad mieszańcami, co w dużej mierze należy przypisać pracom Halla i Johnsona. W roku 1959 ukazała się praca Halla (1959) przedstawiająca immunoelektroforetyczną analizę allopoliploidalnego pszenżyta oraz jego gatunków rodzicielskich. Wstępne badania białkowych ekstraktów ziarna, poprzedzające analizę immunochemiczną, przeprowadzone były metodą elektroforezy na żelu agarowym. Praca ta zasługuje na szczególne podkreślenie z dwóch zasadniczych względów. Z jednej strony wymaga uwagi jako praca zapoczątkowująca powszechne wykorzystanie elektroforetycznej analizy białek w taksonomii roślin. Z drugiej strony dostarcza cenne informacje o składzie białek amfiploidalnego mieszańca. W wyniku przeprowadzonych badań Hall stwierdził w ekstrakcie amfiploida wszystkie białka wykryte u gatunków rodzicielskich z wyjątkiem jednej frakcji charakterystycznej dla żyta. Zjawisko „sumowania się” u amfiploida obrazów białkowych form rodzicielskich zaobserwowane zostało następnie przez Halla i Johnsona (1962) w odniesieniu do *Stiporyzopsis hymenoides*; obraz elektroforetyczny syntetycznego amfiploida odpowiadał obrazowi uzyskanemu z nałożenia na siebie obrazów elektroforetycznych gatunków rodzicielskich: *Stipa viridula* i *Oryzopsis hymenoides*.

Przedstawione wyżej wyniki badań nad syntetycznymi amfiploidami były punktem wyjścia do badań filogenetycznych. Pozwoliły one założyć, że obraz elektroforetyczny białek allopoliploida, w początkowym okresie po połączeniu genomów, reprezentuje sumę obrazów rodzicielskich. Wychoząc z takiego założenia zastosowano elektroforetyczną analizę białek ziarna w badaniach nad pokrewieństwem gatunków i pochodzeniem genomów w serii naturalnych amfiploidów w obrębie *Triticinae*. Ramy niniejszego artykułu nie pozwalają na szczegółowe omówienie licznych prac przedstawiających te badania, można jedynie przytoczyć niektóre z uzyskanych wyników.

Elektroforetyczna analiza homologii białkowych potwierdziła obecność trzech, dających się częściowo rozróżnić, genomów w serii amfiploidów *Triticum*. Zgodnie z obserwacjami cytologicznymi dotyczącymi koniugacji chromosomów w mejozie, obrazy elektroforetyczne wskazywały, że genom A tetraploidu nie jest całkowicie homologiczny z genomem A diploidu. Sugeruje to albo różne pochodzenie obu genomów A, albo zróżnicowanie genomu A już po wystąpieniu poliploidalności. Analiza elektroforetyczna wskazywała na *Aegilops* jako na dawcę genomu B, poddawała jednak w wątpliwość pochodzenie tego genomu z *Ae. bicornis* lub *Ae. speltoides*.



Z danych elektroforetycznych wynikało również, że dawcą genomu D heksaploidalnej pszenicy może być *Ae. squarrosa* (Johnson, Hall 1965; Hall, Johnson, Olered 1966; Johnson, Hall 1966).

Elektroforetyczna analiza białek ziarna, łatwo odróżniająca tetraploidalne pszenice grupy Emmer (AABB) od tetraploidów grupy Timopheevi (AAGG), umożliwiła ustalenie na nowej drodze geograficznego rozprzestrzenienia oraz wewnętrznej zmienności genomów B i G w naturalnych stanowiskach. Stwierdzone elektroforetycznie homologie białkowe potwierdziły dane cytologiczne, że grupa Emmer pochodzi z rasy Syryjsko-Palestyńskiej, grupa Timopheevi natomiast z rasy Transkaukaskiej wspólnego dzikiego przodka — *T. diccoides* (Johnson 1967a; Johnson, Barnhart, Hall 1967).

O przydatności elektroforetycznej analizy białek nasion w badaniach filogenetycznych świadczy również praca nad pochodzeniem *Triticum zhukovskyi* (AAAAGG) (Johnson 1968). Johnson przedstawił przekonujące dane elektroforetyczne na poparcie tezy, że ten heksaploidalny gatunek powstał ze skrzyżowania tetraploidalnego gatunku *T. timopheevi* Zhuk. (AAGG) z gatunkiem diploidalnym *T. monococcum* (AA).

Badania elektroforetyczne białek ziarna pozwoliły wykryć istniejące typy dawców genomów tetraploidalnego gatunku *Aegilops cylindrica* (CCDD), w zróżnicowanych populacjach jego diploidalnych przodków: *Ae. caudata* (CC) i *Ae. squarrosa* L. (DD) (Johnson 1967b). Schematy elektroforetyczne potwierdziły również hipotezę, wysuniętą na podstawie badań kariotypu, że *Ae. umbellulata* ( $2n = 14$ ) jest wspólnym przodkiem szeregu poliploidalnych gatunków *Aegilops* (Waines 1969).

W badaniach filogenetycznych *Triticinae* zastosowanie znalazła również analiza elektroforetycznych wariantów enzymów. Ciekawe wyniki uzyskali Barber i wsp. (1968) badając izoenzymy esteraz. Na szczególną uwagę zasługuje wykrycie u *Triticale* charakterystycznej formy enzymu, nie występującej w rodzicielskich liniach pszenicy i żyta. Zdaniem autorów najprostszym wyjaśnieniem pochodzenia tego enzymu jest założenie, że jest to dimer utworzony z heteromerów, z których jeden kontrolowany jest przez gen pszenicy a drugi przez gen żyta.

Analiza białek zapasowych wykazywała z reguły sumowanie u mieszańca obrazów elektroforetycznych form rodzicielskich. W przypadku białek enzymatycznych zjawisko tworzenia specyficznych dla mieszańca enzymów obserwowane było przez wielu autorów i w odniesieniu do różnych układów enzymatycznych (Mitra, Bhatia 1971; Scandalios 1965, 1966, 1968; Schwartz 1960, 1962, 1964; Schwartz, Endo 1966). Barber i wsp. (1968) sugerują, że tworzenie enzymów mieszańcowych może być odpowiedzialne za dwa zjawiska: bujności mieszańców, czyli heterozji oraz dużych możliwości polipeptydów w przystosowywaniu się do zróżnicowanych warunków.



ków środowiska. Warto nadmienić, że słuszność tej tezy zyskała już poparcie. Schwartz i Laughner (1969), w oparciu o analizę polimorfizmu dehydrogenazy alkoholowej u kukurydzy, wysunął przypuszczenie, że bujność mieszańców może wynikać z łączenia się z heterozygotami alleli determinujących aktywne, ale niestabilne formy enzymatyczne z allelami określającymi stabilne, ale nieaktywne enzymy; w wyniku współdziałania produktów genowych powstają enzymy mieszańcowe zarówno stabilne jak i aktywne.

Sing i Brewer (1969), w wyniku badań układów enzymatycznych w serii naturalnych poliploidów *Triticinae*, stwierdzili zależność między stopniem zróżnicowania form enzymów, mierzonym techniką zymogramów, a zasięgiem geograficznym gatunków; gatunki *Triticum*, o szerokim zasięgu, wykazywały znacznie większą różnorodność form enzymów, niż pokrewne gatunki *Aegilops*, które charakteryzuje znacznie mniejsza zdolność adaptacyjna.

Elektroforetyczna analiza wariantów esteraz i dehydrogenazy alkoholowej u *Triticinae* (Bhatia 1968) wykazała duże zróżnicowanie diploidów i tetraploidów; tetraploidy wykazywały obecność dodatkowych form enzymatycznych. Nie stwierdzono natomiast zróżnicowania między tetraploidami i heksaploidami. Przyczyną braku różnic może być, zdaniem Bhatii, całkowita homologia form enzymatycznych dawcy genomu D (*Ae. squarrosa*) z formami tetraploidów lub też utrata względnie nieaktywność odpowiednich genów tego genomu.

Elektroforetyczna analiza białek stosowana była z powodzeniem również w badaniach nad mieszańcami z rodzaju *Brassica*. Vaughan i Waite (1967b) analizowali elektroforetycznie kilka układów enzymatycznych nasion i przedstawili dane potwierdzające hipotezę, że *B. carinata*, *B. juncea* i *B. napus* są gatunkami amfiploidalnymi, powstałymi w wyniku skrzyżowania *B. nigra*, *B. oleracea* i *B. campestris*. Vaughan i Denford (1968), w oparciu o elektroforetyczną analizę frakcji albuminowych i globuliny nasion szeregu gatunków *Brassica*, wysunęli przypuszczenie, że *B. campestris* najbliższa jest przodkowi badanych gatunków. Jak autorzy podkreślają, hipoteza ta zgodna jest z badaniami cytologicznymi sugerującymi, że podstawowa liczba chromosomów u przodka *Brassica* była 5 i że *B. campestris* ( $n = 10$ ) jest najbliższym podstawowego pnia istniejącym poliploidem.

#### Badania nad genetyczną strukturą naturalnych populacji

W analizie genetycznej struktury naturalnych populacji dużą rolę odegrać mogą badania polimorfizmu białek prowadzone przy pomocy technik elektroforetycznych (Lewontin 1967; Shaw 1965). Prace nad polimorfiz-

mem enzymów w naturalnych populacjach *Avena fatua* i *A. barbata* ilustrują znaczenie tych badań (Marshall i Allard 1969, 1970a, 1970b).

Marshall i Allard podejmując badania elektroforetycznych wariantów enzymów nawiązali do wcześniejszych prac. Jak uprzednio stwierdzono, populacje *A. fatua* były częściej wysoce polimorficzne, w odniesieniu do kilku uwzględnionych cech morfologicznych, niż populacje *A. barbata*, a ponadto wykazywały większą zmienność genetyczną odnośnie badanych cech ilościowych. Populacje *A. barbata* wykazywały większą zmienność fenotypową niż populacje *A. fatua*. Na podstawie tych obserwacji postulowano, że omawiane gatunki *Avena* różnią się pod względem strategii adaptacyjnej; przystosowywanie się *A. barbata* do czasowo i przestrzennie zróżnicowanych siedlisk uwarunkowane jest w mniejszym stopniu zmiennością genetyczną, a w większym — elastycznością rozwojową. Badania nad elektroforetycznymi wariantami enzymów miały na celu sprawdzenie tej hipotezy.

W wyniku elektroforetycznej analizy kilku układów enzymatycznych liści potwierdzono, że *A. fatua* wykazuje większy stopień zmienności genetycznej niż *A. barbata*. Wykazano ponadto, że jest to uwarunkowane zarówno większym udziałem polimorficznych loci, jak i większym stopniem polimorfizmu związanym z każdym locus. Według szacunkowej wyceny 31% loci u *A. barbata*, a 54% loci u *A. fatua* wykazywało polimorfizm form enzymów. Stwierdzono również ścisłą korelację między stopniem polimorfizmu enzymów a stopniem polimorfizmu cech morfologicznych.

Przedstawione wyżej badania obejmowały populacje kalifornijskie. Singh i Jain (1971) analizowali elektroforetyczne warianty enzymów w populacjach *A. barbata* rejonu M. Śródziemnego, skąd gatunki *Avena* przeniesione zostały do Kalifornii. Autorzy potwierdzili znaczną zgodność między wskaźnikami polimorfizmu dla cech morfologicznych oraz dla elektroforetycznych wariantów enzymów. Dane dotyczące genetycznej zmienności *A. barbata*, uzyskane w oparciu o analizę populacji kalifornijskich oraz populacji z rejonu M. Śródziemnego, były bardzo zbliżone. Ta interesująca obserwacja wyłoniła szereg problemów dotyczących ewolucji gatunku.

#### Uwagi końcowe

W czasopismach botanicznych, genetycznych i biochemicznych ukazało się ostatnio wiele publikacji przedstawiających zastosowanie elektroforetycznej analizy białek w badaniach taksonomicznych roślin. Nie było możliwe omówienie wszystkich tych prac. Przedwczesna byłaby również próba podsumowania wkładu, jaki badania te wniosły do taksonomii roślin; omawiany typ badań prowadzony jest na szerszą skalę zaledwie od kilku lat, prace mają często charakter fragmentaryczny, a uzyskiwane informacje

reprezentują różną wartość w zależności od metodycznego poziomu badań. Niemniej, jak wynika z danych przedstawionych w niniejszym artykule, już na obecnym etapie można stwierdzić, że elektroforetyczna analiza białek pomocna jest w rozwiązywaniu licznych problemów z różnych dziedzin badań taksonomicznych i stanowi cenne uzupełnienie innych metod eksperymentalnej taksonomii.

## LITERATURA

- Alston R.E., Turner B.L.: 1963. Biochemical systematics. Prentice Hall, New Jersey
- Anfinsen C.B.: 1960. The molecular basis of evolution. John Wiley and Sons, Inc., New York
- Baranowski T.: 1970. Zależność między budową a funkcją białek. Post. Biochem. 16, 319—345
- Barber H.N., Driscoll C.J., Long P.M., Vickery R.S.: 1968. Protein genetics of wheat and homeologous relationships of chromosomes. Nature, 218, 450—452
- Barber J.T., Steward F.C.: 1968. The proteins of *Tulipa* and their relation to morphogenesis. Developmental Biology, 17, 326—349
- Bhatia C.R.: 1968. Electrophoresis of analogous enzymes in *Triticinae*. Proc. 3rd Int. Wheat Genet. Symp. Canberra. Aust. Acad. Sci. Canberra, 111—115
- Boulter D., Thurman D.A.: 1968. Acrylamide gel electrophoresis of proteins in plant systematics In J.G. Hawkes (ed.) „Chemotaxonomy and serotaxonomy”, Academic Press, London—New York, pp. 39—48
- Boulter D., Thurman D.A., Derbyshire E.: 1967. A disc electrophoretic study of globulin proteins of legume seeds with reference to their systematics. New Phytol., 66, 27—36.
- Boulter D., Thurman D.A., Turner B.L.: 1966. The use of disc electrophoresis of plant proteins in systematics. Taxon, 15, 135—143
- Catsimpoilas N.: 1970. A note on dissimilar subunits present in dissociated soybean globulins. Cereal Chem., 47, 70—71.
- Chang L.O., Srb A.M., Steward F.C.: 1962. Electrophoretic separations of the soluble proteins of *Neurospora*. Nature, 193, 756—759
- Davis B.J.: 1964. Disc electrophoresis — II. Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 404—427
- Davis B.J., and Ornstein L.: 1959. A new high resolution electrophoresis method. Delivered at the Society for the Study of Blood at the New York Academy of Medicine, March 24. Cyt. za: Davis 1964
- Desborough S., Peloquin S.J.: 1966. Disc electrophoresis of tuber proteins from *Solanum* species and interspecific hybrids. Phytochemistry, 5, 727—733
- Desborough S., Peloquin S.J.: 1969. Acid gel disc electrophoresis of tuber proteins from *Solanum* species. Phytochemistry, 8, 425—429
- Ewart I.A.D.: 1966. The interaction of proteins during gel electrophoresis. J. Sci. Fd Agric., 17, 526—532
- Fairbrothers D.E.: 1968. Chemosystematics with emphasis on systematic serology. In V.H. Heywood (ed.) „Modern methods in plant taxonomy”, Academic Press, London—New York, pp. 141—174
- Fairbrothers D.E.: 1969. Comparisons of proteins obtained from diverse plant organs for chemosystematic research. Rev. roum. Biochim., 6, 95—103

- Fox D.J., Thurman D.A., Boulter D.: 1964. Studies on the proteins of seeds of the Leguminosae — I. Albumins. *Phytochemistry*, 3, 417—419
- Gordon A.H.: 1969. Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels. In T.S. Work, E Work (ed.) „Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology”. North Holland Publ. Comp., Amsterdam, Vol. I., cz. I
- Grant D.G., Lawrence J.M.: 1964. Effects of sodium dodecyl sulfate and other dissociating reagents on the globulins of peas. *Arch. Biochem. Biophys.*, 108, 552—561
- Grossbach U.: 1965. Acrylamide gel electrophoresis in capillary columns. *Biochim. Biophys. Acta*, 107, 180—182
- Hall O.: 1959. Immunoelectrophoretic analysis of allopolyploid rye wheat and its parental species. *Hereditas*, 45, 495—504
- Hall O., Johnson B.L.: 1962. Electrophoretic analysis of the amphiploid of *Stipa viridula* x *Oryzopsis hymenoides* and its parental species. *Hereditas*, 48, 530—535
- Hall O., Johnson B.L., Olered R.: 1966. Evaluation of genome relationships in wheat from their protein homologies. *Proc. 2nd. Int. Wheat Genetics Symp.*, Lund 1963. *Hereditas*, Suppl. Vol. 2, 47—54
- Hawkes J.G. (ed.): 1968. Systematics Association Special Volume No 2. „Chemotaxonomy and serotaxonomy”, Academic Press, London—New York
- Hegnauer R.: 1962—1965. Chemotaxonomie der Pflanzen. Band I—V Birkhauser Verlag Basel und Stuttgart
- Heywood V.H. (ad.): 1968. Modern methods in plant taxonomy. Academic Press, London—New York
- Hunter R.L., Markert C.L.: 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*, 125, 1294—1295
- Hyden H., Bjurstam K., McEwen B.: 1966. Protein separation at the cellular level by micro disc electrophoresis. *Analyt. Biochem.*, 17, 1—15
- Hynes M.J.: 1968. Genetically controlled electrophoretic variants of a storage protein in *Pisum sativum*. *Aust. J. biol. Sci.*, 21, 827—829
- Ingram V.M.: 1958. Abnormal human haemoglobins. I. The comparison of normal human and sickle-cell haemoglobins by „fingerprinting”. *Biochim. Biophys. Acta* 28, 539—545
- Jackson P., Milton J.M., Boulter D.: 1967. Fingerprint pattern of the globulin fraction obtained from seeds of various species of the Fabaceae. *New Phytol.*, 66, 47—56
- Johnson B.L.: 1967a. Tetraploid wheats: Seed protein electrophoretic patterns of the Emmer and Timopheevi groups. *Science*, 158, 131—132
- Johnson B.L.: 1967b. Confirmation of the genome donors of *Aegilops cylindrica*. *Nature*, 216, 859—862
- Johnson B.L.: 1968. Electrophoretic evidence on the origin of *Triticum zhukovskiyi*. *Proc. 3rd. Int. Wheat Genet. Symp. Canberra 1968. Aust. Acad. Sci. Canberra*, 105—110
- Johnson B.L.: 1970. The protein electrophoresis approach to species relationships in wheat. *Genetic Lectures*, Vol. 1, ed. by Ralph Bogart, Oregon State University Press, Corvallis, Oregon, pp. 19—44
- Johnson B.L., Barnhart D., Hall O.: 1967. Analysis of genome and species relationships in the polyploid wheats by protein electrophoresis. *Amer. J. Bot.*, 54, 1089—1098
- Johnson B.L., Hall O.: 1965. Analysis of phylogenetic affinities in the Triticinae by protein electrophoresis. *Amer. J. Bot.*, 52, 506—513



- Johnson B.L., Hall O.: 1966. Electrophoretic studies of species relationships in *Triticum*. *Acta Agr. Scand.*, Suppl., 16, 222—224
- Johnson B.L., Thein M.M.: 1970. Assessment of evolutionary affinities in *Gossypium* by protein electrophoresis. *Amer. J. Bot.*, 57, 1081—1092
- Larsen A.L.: 1967. Electrophoretic differences in seed proteins among varieties of soybean, *Glycine max* (L.) Merrill. *Crop Science*, 7, 311—313
- Leone C.A. (ed.): 1964. Taxonomic biochemistry and serology. The Ronald Press Co., New York
- Lewontin R.C.: Population genetics. *Ann. Rev. Genetics*, 1, 37—70
- Markert C.L., Moller F.: 1959. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenic and species specific patterns. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 45, 753—763
- Marshall D.R., Allard R.W.: 1969. The genetics of electrophoretic variants in *Avena*. I. The esterase  $E_4$ ,  $E_9$ ,  $E_{10}$ , phosphatase  $P_5$  and anodal peroxidase  $APX_5$  loci in *A. barbata*. *Jour. Hered.*, 60, 17—19
- Marshall D.R., Allard R.W.: 1970a. Isozyme polymorphisms in natural populations of *Avena fatua* and *A. barbata*. *Heredity*, 25, 373—382
- Marshall D.R., Allard R.W.: 1970b. Maintenance of isozyme polymorphisms in natural populations of *Avena barbata*. *Genetics*, 66, 393—399
- Mitra R., Bhatia C.R.: 1971. Isoenzymes and poliploidy — I: Qualitative and quantitative enzyme studies in the *Triticinae*. *Praca przyjęta do druku w Genetical Research. Streszczenie pracy przekazał C.R. Bhatia.*
- Müntzing A.: 1969. On the methods of experimental taxonomy. *Amer. J. Bot.*, 56, 791—798
- Ornstein L.: 1964. Disc electrophoresis — I. Background nad theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 321—349
- Ornstein L., Davis B.J.: 1962. Disc electrophoresis. Preprint by Distillation Product Industries (Eastman Kodak Co.), Rochester, N.Y., cyt. za: Ornstein 1964, Davis 1964
- Ostrowski W.: 1970. Elektroforeza w badaniach biochemicznych i klinicznych, PWN, Warszawa
- Parker W.C., Bearn AG.: 1963. Boric acid-induced heterogeneity of conalbumin by starch gel electrophoresis. *Nature*, 199, 1184—1186
- Pauling L., Zuckerkandl E.: 1963. Chemical paleogenetics. Molecular „restoration studies” of extinct forms of life. *Acta Chem. Scand.*, 17, Suppl. 1, S 9 — S 16
- Przybylska J., Hurich J.: 1971a. The use of basic and acidic gel systems in disc electrophoretic studies of seed proteins of some *Medicago* species. *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. sci. biol.*, 19, 31—36
- Przybylska J., Hurich J.: 1971b. Disc electrophoretic study of seed proteins of various *Medicago* species, *Melilotus albus*, *Trifolium pratense* and *T. repens*. *Acta Soc. Bot. Polon.*, 40, 681—695
- Raymond S., Weintraub L.: 1959. Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science*, 130, 711
- Reisfeld R.A., Lewis U.J., Williams D.E.: 1962. Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature*, 195, 281—283
- Scandalios J.G.: 1965. Subunit dissociation and recombination of catalase isozymes. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 53, 1035—1040
- Scandalios J.G.: 1966. Genetic variation of alcohol dehydrogenase in maize. *Genetics*, 54, 359—360
- Scandalios J.G.: 1968. Genetic control of multiple molecular forms of catalase in maize. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 151, 274—293

- Schwartz D.: 1960. Genetic studies on mutant enzymes in maize: synthesis of hybrid enzymes by heterozygotes. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 46, 1210—1215
- Schwartz D.: 1962. Genetic studies on mutant enzymes in maize. II. On the mode of synthesis of the hybrid enzymes. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 48, 750—756
- Schwartz D.: 1964. A second hybrid enzyme in maize. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 51, 602—605
- Schwartz D., Endo T.: 1966. Alcohol dehydrogenase polymorphism in maize — simple and compound loci. *Genetics*, 53, 709—715
- Schwartz D., Laughner W.J.: 1969. A molecular basis for heterosis. *Science*, 164, 626—627
- Shannon L.M.: 1968. Plant isoenzymes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 19, 187—210
- Shaw C.R.: 1965. Electrophoretic variation in enzymes. *Science*, 149, 936—943
- Silano V., de Cillis U., Pocchiari F.: 1969. Varietal differences in albumin and globulin fractions of *Triticum aestivum* and *T. durum*. *J. Sci. Fd. Agric.*, 20, 260—261
- Simon J.P.: 1969. Serological studies in *Medicago*, *Melilotus*, *Trigonella* and certain other genera of the Leguminosae. I. Quantitative precipitin tests and immunodiffusion techniques. *Bot. Gaz.*, 130, 127—141
- Sing C.F., Brewer G.J.: 1969. Isoenzymes of a polyploid series of wheat. *Genetics*, 61, 391—398
- Singh R.S., Jain S.K.: 1971. Population biology of *Avena*. II. Isoenzyme polymorphisms in populations of the Mediterranean Region and Central California. *Theoretical and Applied Genetics*, 41, 79—84
- Skangiel-Kramska J.: 1969. Własności i biologiczna rola izoenzymów. *Post. Biochem.*, 15, 385—396
- Smithies O.: 1955. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.*, 61, 629—641
- Smithies O.: 1959. Zone electrophoresis in starch gels and its application to studies of serum proteins. *Advances in protein chemistry*. Academic Press, New York and London, Vol. 14, pp. 65—113
- Steward F.C., Barber J.T.: 1964. The use of acrylamide gel electrophoresis in the investigation of the soluble proteins in plants. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 525—531
- Steward F.C., Lyndon R.F., Barber J.T.: 1965. Acrylamide gel electrophoresis of soluble plant proteins: A study on pea seedlings in relation to development. *Amer. J. Bot.*, 52, 155—164
- Swain T. (ed.): 1963. *Chemical plant taxonomy*. Academic Press, New York
- Swain T. (ed.): 1966. *Comparative phytochemistry*. Academic Press, New York
- Thurman D.A., Boulter D., Derbyshire E., Turner A.L.: 1967. Electrophoretic mobilities of formic and glutamic dehydrogenases in the Fabaceae: A systematic survey. *New Phytol.*, 66, 37—45
- Vaughan J.G.: 1968a. Seed protein studies of *Brassica* and *Sinapis* species. In J.G. Hawkes (ed.) „Chemotaxonomy and serotaxonomy”, Academic Press, London—New York, pp. 93—102
- Vaughan J.G.: 1968b. Serology and other protein separation methods in studies of angiosperm taxonomy. *Sci. Prog., Oxf.*, 56, 205—222
- Vaughan J.G., Denford K.E.: 1968. An acrylamide gel electrophoretic study of the seed proteins of *Brassica* and *Sinapis* species, with special reference to their taxonomic value. *J. Exp. Bot.*, 19, 724—732
- Vaughan J.G., Waite A.: 1967a. Comparative electrophoretic studies of the seed proteins of certain species of *Brassica* and *Sinapis*. *J. Exp. Bot.*, 18, 100—109

- V a u g h a n J.G., W a i t e A.: 1967b. Comparative electrophoretic studies of the seed proteins of certain amphiploid species of Brassica. *J. Exp. Bot.*, 18, 269—276
- V a u g h a n J.G., W a i t e A., B o u l t e r D., W a i t e r s S.: 1965. Taxonomic investigation of several Brassica species using serology and the separations of proteins by electrophoresis on acrylamide gels. *Nature*, 208, 704—705
- V o u g h a n J.G., W a i t e A., B o u l t e r D., W a i t e r s S.: 1966. Comparative studies of the seed proteins of Brassica campestris, Brassica oleracea and Brassica nigra. *J. Exp. Bot.*, 17, 332—343
- W a i n e s J.G.: 1969. Electrophoretic-systematic studies in Aegilops, Dissertation Abstracts, XXX, No 5. University of California, Riverside (Order No. 69—19, 131)
- W h i t n e y P.J., V a u g h a n J.G., H e a l e J.B.: 1968. A disc electrophoretic study of the proteins of Verticillium albo-atrum, Verticillium dahliae and Fusarium oxysporum with reference to their taxonomy. *J. Exp. Bot.*, 19, 415—426
- W i l l i a m s D.E., R e i s f e l d R.A.: 1964. Disc electrophoresis in polyacrylamide gels: extension to new conditions of pH and buffer. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 373—381
- Z u c k e r k a n d l E., P a u l i n g L.: 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.*, 8, 357—366.