

JERZY PUCHALSKI  
*Zakład Genetyki Roślin PAN*

## BADANIA CHEMOTAKSONOMICZNE ZBÓŻ

### *Wstęp*

Chemotaksonomia jest nową dziedziną zyskującą coraz większe uznanie wśród badaczy zajmujących się systematyką bakterii, zwierząt i roślin. Ten wzrost zainteresowania metodami chemotaksonomicznymi ma związek z rozwojem chemii i biochemii, a zwłaszcza z rozwojem nowoczesnych technik analitycznych. Dzięki nowoczesnym metodom analitycznym można szybko i dokładnie określić charakterystykę chemiczną roślin, która jest pomocna w badaniach taksonomicznych. Okazało się bowiem, że biosynteza składników chemicznych roślin jest kontrolowana genetycznie. Badania chemotaksonomiczne wykorzystując najnowsze osiągnięcia chemii i biochemii pozwalają na bardzo precyzyjny opis i scharakteryzowanie składu chemicznego rośliny, a następnie na umiejscowienie danej rośliny w systemie klasyfikacyjnym.

Dotychczas podstawowymi metodami badań taksonomicznych roślin były badania morfologiczne, a zwłaszcza badania cytogenetyczne. Metody te w dalszym ciągu są stosowane w większości laboratoriów taksonomicznych, jednak chemotaksonomia pozwala na bardzo istotne ich uzupełnienie. Wydaje się nawet, że chemotaksonomia może już w niedługim czasie zastąpić inne metody badań systematycznych, gdyż w porównaniu z nimi posiada szereg zalet. Najważniejszą z nich jest możliwość znacznie dokładniejszej klasyfikacji roślin. Wiadomo jest, że ewolucja roślin zachodziła zarówno pod wpływem czynników wewnętrznych, jak i zewnętrznych związanych z warunkami środowiskowymi, co doprowadziło do zakłócenia porządku w systemach klasyfikacji opartych na filogenezie. Dlatego też w badaniach taksonomicznych popełnia się i powtarza błędy. Chemotaksonomia może temu zapobiec, gdyż jak już wspomniano, skład chemiczny roślin jest kontrolowany genetycznie (Heslop-Harrison, 1963). Bardzo duże znaczenie ma także szybkość i dokładność metod analitycznych stosowanych obecnie w chemii i biochemii.

Badania chemotaksonomiczne objęły już bardzo dużą grupę roślin, w tym także i rośliny zbożowe. Uzyskane zostały już bardzo ważne wyniki w tym zakresie. Wydaje się, że celowe będzie zapoznanie się z za-

łożeniami badań chemotaksonomicznych oraz z wynikami uzyskanymi dzięki ich zastosowaniu do badań zbóż.

### *Podstawy i rozwój chemotaksonomii roślin*

Jak już wspomniano poprzednio, rozwój chemotaksonomii zachodzi bardzo żywiłowo. Za datę powstania chemotaksonomii uważa się zwykle lata pięćdziesiąte naszego stulecia, to znaczy od tego czasu metody chemiczne i biochemiczne zostały powszechnie włączone do badań taksonomicznych roślin. Oczywiście już bardzo dawno zwracano uwagę na możliwość wykorzystania charakterystyki chemicznej roślin dla celów systematyki. Już średniowieczni zielarze zauważyli, że rośliny o podobnych właściwościach leczniczych są podobne do siebie anatomicznie. W końcu XVII wieku trzech uczeni — Petiver, Grew i Camerarius porównując cechy smakowe, zapachowe i lecznicze różnych roślin stwierdzili, że cechy te powiązane są z cechami morfologicznymi. W XIX wieku niektórzy badacze zaczynają wykorzystywać praktycznie cechy chemiczne w studiach systematycznych roślin. W tym czasie na przykład de Candolle między innymi na podstawie składu chemicznego oddzielił *Jasmineae* od *Oleinae*. Wielu uczonych interesowało się także występowaniem i rozmieszczeniem różnych związków chemicznych w roślinach. Głównie zwracali oni uwagę na alkaloidy. Za twórcę fitochemii porównawczej — prekursorki chemotaksonomii uważa się Greshoffa. Zdefiniował on dokładnie tę dziedzinę oraz jej cele, a poza tym oznaczył zawartość alkaloidów, tanin i saponin w bardzo dużej grupie roślin. Bardzo istotne znaczenie dla rozwoju podstaw chemotaksonomii roślin miały prace prowadzone przez Mc Naira w latach 1917—1945, gdyż wprowadził on już zupełnie świadomie i celowo metody fitochemii porównawczej do studiów systematycznych. Momentem przełomowym dla rozwoju fitochemii i chemotaksonomii roślin stały się metody chromatografii, za pomocą których można było rozdzielać i identyfikować bardzo wiele różnych związków chemicznych. W roku 1941 Martin i Synge opracowali specjalną technikę chromatograficzną do oznaczania aminokwasów, za co otrzymali nawet nagrodę Nobla. W trzy lata później, w roku 1944 Consden, Gordon i Martin opisali metodę chromatografii bibułowej umożliwiającą w sposób prosty i dokładny oznaczenie takich związków jak aminokwasy, węglowodany, barwniki, alkaloidy czy kwasy tłuszczowe. Metoda ta została wprowadzona do większości laboratoriów fitochemicznych i pozwoliła na bardzo bujny rozwój fitochemii, co zwróciło uwagę na metody chemotaksonomiczne (Gibbs, 1963; Fairbrothers, 1968).

W latach pięćdziesiątych chemotaksonomią zainteresowało się już wielu badaczy. W ciągu ostatnich kilkunastu lat zorganizowano wiele międzynarodowych sympozjów i konferencji poświęconych zagadnieniom

fitochemii porównawczej, biochemii w aspekcie taksonomicznym oraz sympozjów zajmujących się sprawami czysto chemotaksonomicznymi i serotaksonomicznymi. Wyrazem wzrostu znaczenia chemotaksonomii było powołanie Międzynarodowego Komitetu Chemotaksonomii. Powstał on 11 kwietnia 1964 r. w Kioto z inicjatywy Międzynarodowego Związku Chemii Teoretycznej i Stosowanej (International Union of Pure and Applied Chemistry) oraz Międzynarodowego Stowarzyszenia Taksonomii Roślin (International Association of Plant Taxonomy) (Alston, 1967).

Znaczenie chemotaksonomii wzrasta wraz z undoskonalaniem i wprowadzaniem nowych metod analitycznych. Opracowane zostały nowe metody chromatografii jak chromatografia cienkwarstwowa, jonowymieniana i gazowa. Dla badań nad białkami ogromne znaczenie miało wprowadzenie metod ich rozdzielania za pomocą tzw. elektroforezy, tj. wykorzystanie różnic w ruchliwości w czasie wędrówki na odpowiednim nośniku pod wpływem pola elektrycznego.

Identyfikację i badania strukturalne skomplikowanych związków organicznych umożliwiły metody analizy spektralnej jak spektrofotometria w nadfiolecie i podczerwieni, spektroskopia masowa, a zwłaszcza metoda magnetycznego rezonansu jądrowego (Erdtman, 1969).

Dla określenia badań systematycznych roślin metodami chemicznymi i biochemicznymi, oprócz nazwy chemotaksonomia roślin, spotkać można w literaturze również i inne propozycje, jak fitochemia porównawcza, czy systematyka chemiczna roślin. Wydaje się, że nazwa fitochemia porównawcza nie oddaje charakteru biologicznego badań i kładzie nacisk jedynie na ich stronę chemiczną, zaś nazwa systematyka chemiczna jest synonimem określenia chemotaksonomia. Ostatnio coraz większe znaczenie w taksonomii roślin zyskują związki czynne biologicznie jak białka, kwasy nukleinowe i enzymy, zwane pierwszorzędnymi. Badania takie mają już charakter czysto biochemiczny i dlatego też niektórzy uczeni proponują na ich określenie inne nazwy. Na przykład Alston (1967) postuluje nazwę systematyka biochemiczna (biochemical systematics), a Erdtman (1968) — taksonomia molekularna lub inaczej cząsteczkowa (molecular taxonomy). Jednak nazwa chemotaksonomia dobrze oddaje charakter badań i została powszechnie zaakceptowana, dlatego ta nazwa będzie używana w niniejszym opracowaniu.

Składniki chemiczne roślin wykorzystywane w badaniach chemotaksonomicznych podzielono umownie na 2 zasadnicze grupy, tj. związków pierwszorzędnych (primary) i drugorzędnych (secondary). Nazwy te nie świadczą oczywiście, że dany związek ma znaczenie pierwszorzędne czy drugorzędne dla badań taksonomicznych, a podział ten został jedynie podyktowany znaczeniem dla procesów życiowych organizmu (Fairbrothers, 1968). Związki pierwszorzędne są podstawowymi składni-



kami wszystkich organizmów i przeważnie charakteryzują się wysokim ciężarem cząsteczkowym. Spełniają bardzo ważne funkcje fizjologiczne służąc do celów budulcowych, odżywczych oraz wchodząc w skład mechanizmów enzymatycznych. Raczej nie są one odkładane w komórkach w większych ilościach. Należą do tej grupy białka i kwasy nukleinowe. Grupa związków drugorzędnych ma małe znaczenie fizjologiczne. Są one zwykle ubocznymi produktami metabolizmu i mogą służyć jako barwniki, substancje smakowe, zapachowe czy zapasonośne. Mają przeważnie niski ciężar cząsteczkowy i często są kumulowane w organizmach w większych ilościach (Erdtman, 1968). Do związków drugorzędnych należą na przykład różne barwniki jak flawonoidy, betacjany, karoteny, chlorofile, ksantofile, a także alkaloidy, terpeny, aminokwasy niebiałkowe, polisacharydy, kwasy tłuszczowe, woski, garbniki.

W badaniach chemotaksonomicznych roślin nie można korzystać jednak ze wszystkich chemicznych składników roślin. Wyeliminować trzeba z tych badań takie związki chemiczne jak aminokwasy białkowe, cukry proste czy niektóre tłuszcze, oleje i kwasy tłuszczowe, gdyż występują one w większości roślin. Praktycznego znaczenia nie mają również takie związki, które są znajdowane tylko w pojedynczych gatunkach roślin (Erdtman, 1963).

Wielu badaczy na podstawie własnych doświadczeń stwierdziło, że skład chemiczny roślin jest zmienny, co komplikuje nieco badania chemotaksonomiczne. Na skład ten mają wpływ nie tylko interesujące nas głównie czynniki genetyczne, ale również i szereg innych jak morfogenetyczne, środowiskowe, ontogenetyczne, czy nawet sezonowe i dobowe. Różnice z przyczyn morfogenetycznych wynikają z nierównomiernego rozmieszczenia składników w całej roślinie, czego powodem jest nierównoczesne formowanie się wszystkich organów oraz przemieszczanie się tych składników do różnych części rośliny. Z tego też powodu dla celów taksonomicznych powinno brać się w miarę możliwości całą roślinę. Skład chemiczny roślin zmienia się bardzo istotnie w czasie ich wzrostu i rozwoju, a więc badania porównawcze należy prowadzić w tych samych stadiach rozwojowych. Wiadomo jest również, że czynniki środowiskowe typu pogodowego jak nasłonecznienie, temperatura otoczenia, wilgotność oraz warunki glebowe i nawożenia mogą bardzo różnie kształtować skład chemiczny roślin. Zaobserwowano także, że różnice w składzie chemicznym występują w roślinach uprawianych w jednakowych warunkach, ale pochodzących z różnych regionów. Stwierdza się także różnice w ciągu doby czy sezonu (Alston, 1967; Flück, 1963; Heslop-Harrison, 1963). Aby uniknąć błędów, trzeba oczywiście wszystkie wymienione czynniki warunkujące skład chemiczny roślin brać pod uwagę w badaniach taksonomicznych.



Badania chemotaksonomiczne roślin prowadzi się trzema różnymi sposobami: 1) jakościowym 2) ilościowym 3) biosyntetycznym. Sposób jakościowy jest stosowany najczęściej i polega na oznaczaniu obecności wybranego związku chemicznego lub grupy związków w badanych populacjach roślin. Nieraz badania są prowadzone sposobem ilościowym zakładającym porównywanie poziomu zawartości określonego związku w jakiejś odrębnej rodzinie czy nawet rodzaju roślin. Ostatnio coraz większe znaczenie przywiązuje się do trzeciego sposobu badań — biosyntetycznego opartego na studiowaniu dróg biosyntezy jakiegoś wybranego składnika chemicznego rośliny. Okazuje się bowiem, że organizmy o bliskim pokrewieństwie charakteryzują się bardzo podobnymi drogami metabolicznymi. Wiadomo, że o charakterze takiej drogi decyduje system enzymatyczny organizmu i z tego też powodu wielu uczonych uważa, że badania enzymatyczne już niedługo mogą stanowić podstawę badań chemotaksonomicznych. Zakłada się oczywiście badanie aktywności wybranych enzymów, ale poza tym mówi się nawet o poznawaniu sekwencji aminokwasów w białku enzymatycznym (Alston, 1967. Erdtman, 1968; Harborne, 1968).

Przed chemotaksonomią roślin otwierają się bardzo szerokie perspektywy. Wydaje się, że w najbliższych latach będzie ona mogła dominować w badaniach systematyczno-porównawczych większości roślin. Przy jej pomocy będzie można poznać dokładnie filogenezę wielu roślin, w tym także roślin uprawnych, a więc i zbożowych. Wyniki uzyskiwane dzięki chemotaksonomii można będzie interpretować i wykorzystywać następnie dla celów genetyczno-hodowlanych.

Metody chemotaksonomiczne nie były jak dotąd zbyt rozpowszechnione w badaniach systematycznych roślin zbożowych. Jednak badacze zajmujący się chemotaksonomią zbóż, którzy zainteresowali się tymi metodami i włączyli je do swoich badań, uzyskali bardzo ciekawe i obiecujące wyniki. Największe osiągnięcia zanotowali oni dzięki wykorzystywaniu białek i związków fenolowych. Sygnalizowane były również badania w oparciu o kwasy nukleinowe i polisacharydy. Poniżej zostaną omówione niektóre metody badań chemotaksonomicznych zbóż i uzyskane w nich wyniki kolejno według oznaczonych składników chemicznych.

#### *Związki chemiczne wykorzystywane w chemotaksonomii zbóż*

**Białka.** Ziarniaki zbóż zawierają od kilku do kilkunastu procent białek. Na przykład pszenicą ozimą zawiera przeciętnie 10% białek. Białka wchodzące w skład ziarniaków zbóż dzieli się na 4 zasadnicze grupy: 1) albuminy 2) globuliny 3) gluteliny 4) prolaminy. Ze względów technologicznych największe znaczenie mają prolaminy i gluteliny, gdyż

w skład ich wchodzi 2 najważniejsze białka zbóż — gliadyna i glutenina. Gliadyna i glutenina są bowiem głównymi składnikami glutenu decydującego o wartości wypiekowej mąki pszennej (Jankowski, 1967).

W badaniach taksonomicznych można wykorzystać szereg własności białek, jak skład aminokwasowy, sekwencja aminokwasów, ciężar cząsteczkowy, aktywność katalityczna, właściwości immunologiczne, ruchliwość elektroforetyczna, czy charakterystyka chromatograficzna (Boulter, Thurman, 1968).

Największe zastosowanie w chemotaksonomii znalazła metoda rozdziału elektroforetycznego białek. Elektroforeza polega na wykorzystaniu różnic w ruchliwości naładowanych elektrycznie cząstek koloidalnych białek w polu elektrycznym na odpowiednim nośniku. W pierwszych metodach elektroforezy nośnikiem była bibuła nasycona odpowiednim buforem, ale uzyskiwany na niej rozdział był ograniczony. Obecnie opracowano nowe metody elektroforezy pozwalającej na rozdzielenie białek na dużo więcej frakcji. Są to metody tzw. elektroforezy żelowej, gdzie nośnikiem są odpowiednie żele. Zaletą ich jest wykorzystanie dodatkowo oprócz różnic w ruchliwości elektrycznej również tzw. efektu filtracji molekularnej związanego z wymiarami i kształtem cząsteczek białkowych. Zastosowanie znalazły tutaj głównie żele skrobiowe i poliakryloamidowe, a nieraz wykorzystuje również żele agarowe, krzemionkowe i żelatynowe (Boulter, Thurman, 1966, 1968).

Okazało się, że dzięki rozdzielaniu elektroforetycznemu uzyskuje się szereg frakcji, których rodzaj i ilość jest uwarunkowana genetycznie, a kryterium pokrewieństwa genetycznego jest podobne szybkości migracji na żelu lub bibule (Johnson, Hall, 1966).

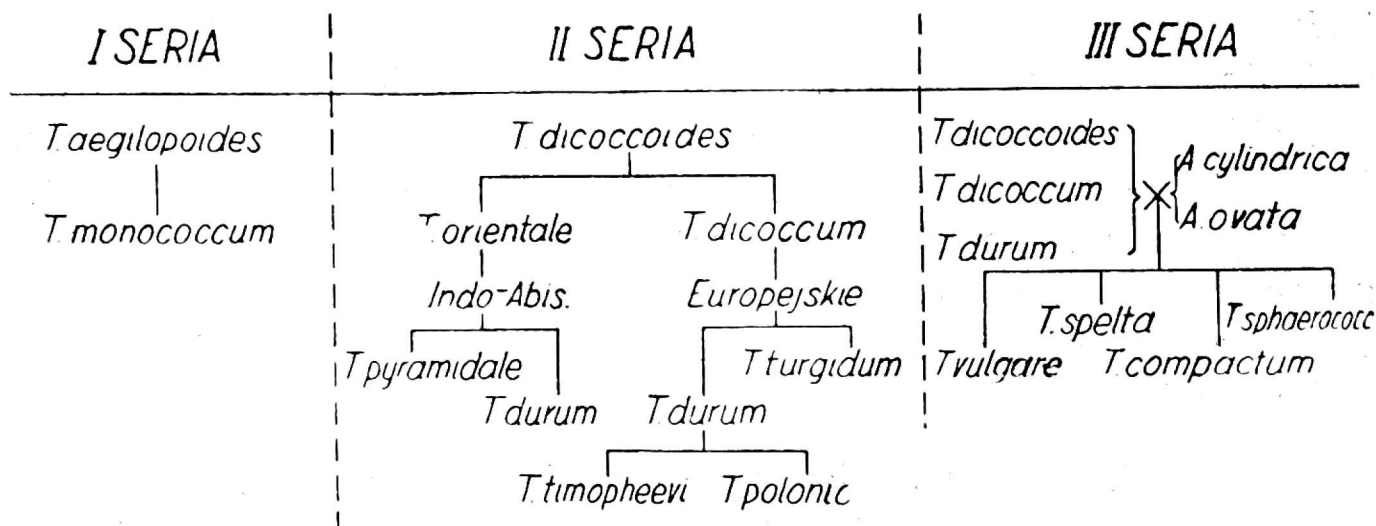
Johnson i Hall (1966) prowadzili elektroforezę białek pochodzących z różnych gatunków *Triticum* i *Aegilops* na żelu poliakryloamidowo-mocznikowym. Z badań ich wynika, że ilość frakcji zależy od genotypu organizmu. Na przykład diploidalna pszenica *T. monococcum* L. o genotypie AA dawała 10—12 frakcji wolnowędrujących i połowa z tych frakcji miała swoje homologi w elektrospektrach gatunków pszenic tetra- i heksaploidalnych. Na podstawie tych wyników Johnson i Hall uważali, że *T. monococcum* może określać donora genomu A w pszenicach poliploidalnych. Jednak dalsze ich badania dowiodły, że dzikie diploidalne gatunki *T. boeoticum* Boiss. wykazują większą homologiczność w tym zakresie. Ekstrakty białek z tetraploidalnej *T. dicoccum* Schübl. (AABB) posiadały o wiele więcej frakcji niż *T. monococcum*, przy czym frakcje homologiczne obu tych gatunków znajdowały się w serii frakcji wolnowędrujących. Charakterystyczne dla tej pszenicy było 8 frakcji, które przypisywane są genomowi B. Białka z heksaploidalnej *T. aestivum* L. ssp. *vulgare*

(AABBDD) posiadały homologiczne frakcje wśród wszystkich frakcji tetraploidalnych z serii szybkowędrujących oraz mało zaznaczone frakcje heksaploidalne, których przedstawicielami były 3 frakcje o największej ruchliwości. Te trzy frakcje nie posiadały homologów w genomach A i B, a więc przypisano je genomowi D. Z badań tych wypływa wniosek, że genomy warunkują ilości i rodzaj frakcji białkowych i decydują o ich szybkości poruszania się w czasie elektroforezy, czyli ściśle określają donora danych frakcji.

Coulson i Sim (1964) rozdzielali elektroforetycznie białka 34 odmian *Triticum vulgare* na żelu skrobiowym i uzyskali przeciętnie około 32 frakcji o dużej homologiczności. Porównywali oni także elektroferogramy i densytogramy białek różnych gatunków należących do *Triticum* i *Aegilops* i zauważyli, że zasadnicze różnice występowały we frakcjach gliadynowych, tj. o małej ruchliwości. Wykorzystując wyniki swoich badań podzielili oni rodzaj *Triticum* na 3 serie. Pod uwagę brali oni zarówno rodzaj, jak i intensywność frakcji. Okazało się, że podobne elektroferogramy miały pszenice *T. durum* i *T. timopheevi*, które były z kolei podobne do elektroferogramu białek *T. dicoccum*. Dużo wzajemnie homologicznych frakcji miały także *T. turgidum* i *T. polonicum*. Wszystkie te 5 gatunków zaliczyli oni do II serii. Cztery inne gatunki o dużym podobieństwie swoich frakcji, a mianowicie *T. spelta*, *T. compactum*, *T. vulgare* i *T. sphaerococcum* zaklasyfikowane zostały do III serii. Natomiast gatunek *T. monococcum* charakteryzujący się zupełnie innym elektroferogramem, nie wykazującym podobieństwa z żadnym z wymienionych gatunków, umieszczony został oddzielnie w I serii. Wyniki uzyskane przez Coulsona i Sima potwierdzają w dużym stopniu wyniki badań prowadzonych metodami cytogenetycznymi. Wiadomo, że wszystkie pszenice zaliczone do III serii są heksaploidalne, a gatunki pszenic umieszczonych w II serii posiadają po 28 chromosomów, czyli są tetraploidalne, a zaś odrębna *T. monococcum* należy do pszenic diploidalnych. Jak widać z tego, ploidalność pszenic znalazła dokładne odbicie w wynikach badań metodami elektroforezy.

Barber ze współprac. (1967) rozdelał elektroforetycznie na żelu poliakryloamidowym oddzielnie albuminy i globuliny oraz gluten z trzech odmian pszenicy — Festival, Mengavi i Gala pochodzących z Australii. Stosował on różne pH buforów w czasie rozdzielania poszczególnych rodzajów białek. I tak globuliny i albuminy ekstrahowane były buforem tris-glicynowym i rozdzielane w pH=8,3, to jest zasadowym. Natomiast gluten był ekstrahowany kwasem octowym i elektroforezę jego prowadzono w odczynie lekko kwaśnym w pH=5,0. Okazało się, że zarówno elektroferogramy albumin i globulin, jak i glutenów pozwalają na wyciągnięcie





Rys. 1. Podział rodzaju *Triticum* (według Coulsona i Sima, 1964). Klasyfikacja ta oparta jest na elektroforetycznym rozdziale frakcji białkowych z ziarniaków badanych gatunków pszenic i jest zgodna z wynikami badań prowadzonych metodami cytogenetycznymi

jednakowych wniosków. Odmiany Mengavi i Gala o wspólnym pochodzeniu genetycznym miały prawie jednakowe frakcje na obu elektroferogramach i wykazywały znacznie więcej frakcji, niż odmiana Festival o innym jak one pochodzeniu. Największe różnice występowały we frakcjach o dużej ruchliwości elektroforetycznej. We frakcjach z odmian Mengavi i Gala stwierdzone zostały jedynie różnice ilościowe, a nie jakościowe.

Wspomniani już Johnson i Hall (1966) w badaniach swoich zajęli się również rozdziałem elektroforetycznym białek mieszańców *Triticale*, których rodzicami byli *Triticum aestivum* o genotypie AABBDD i *Secale cereale* (EE). Stwierdzili oni, że elektroferogram amfidiploidalnego *Triticale* o genotypie AABBDEE ma homologię swoich frakcji u obu rodziców, jednak intensywność ich nie jest jednakowa. Współczynniki korelacji obliczone na podstawie densytogramów wynosiły 0,59 pomiędzy *S. cereale* i *Triticale* oraz 0,92 pomiędzy *Triticale* i *T. aestivum*. Z teoretycznej wielkości gęstości optycznej wynikało, że efekt rodzicielski *Triticum* był trzy razy silniejszy niż *Secale*.

Podobne wyniki uzyskał również Konorew (1969). Rozdzielał on elektroforetycznie na żelu poliakryloamidowym białko kukurydzy zeinę pochodzące z różnych mieszańców i wykazał, że dziedziczyły one frakcje rodziców, jednak z różną intensywnością.

Jak z tego widać, metody elektroforetyczne pozwalają na prowadzenie bardzo ważnych badań dla celów chemotaksonomii. Ostatnio wielu uczonych zajmujących się chemotaksonomią wskazuje także na możliwość wykorzystania w tych badaniach również i innej cechy białek, a mianowicie sekwencji aminokwasów. Metody oparte na badaniu sekwencji aminokwasów białek były zresztą już stosowane w taksonomii bakterii

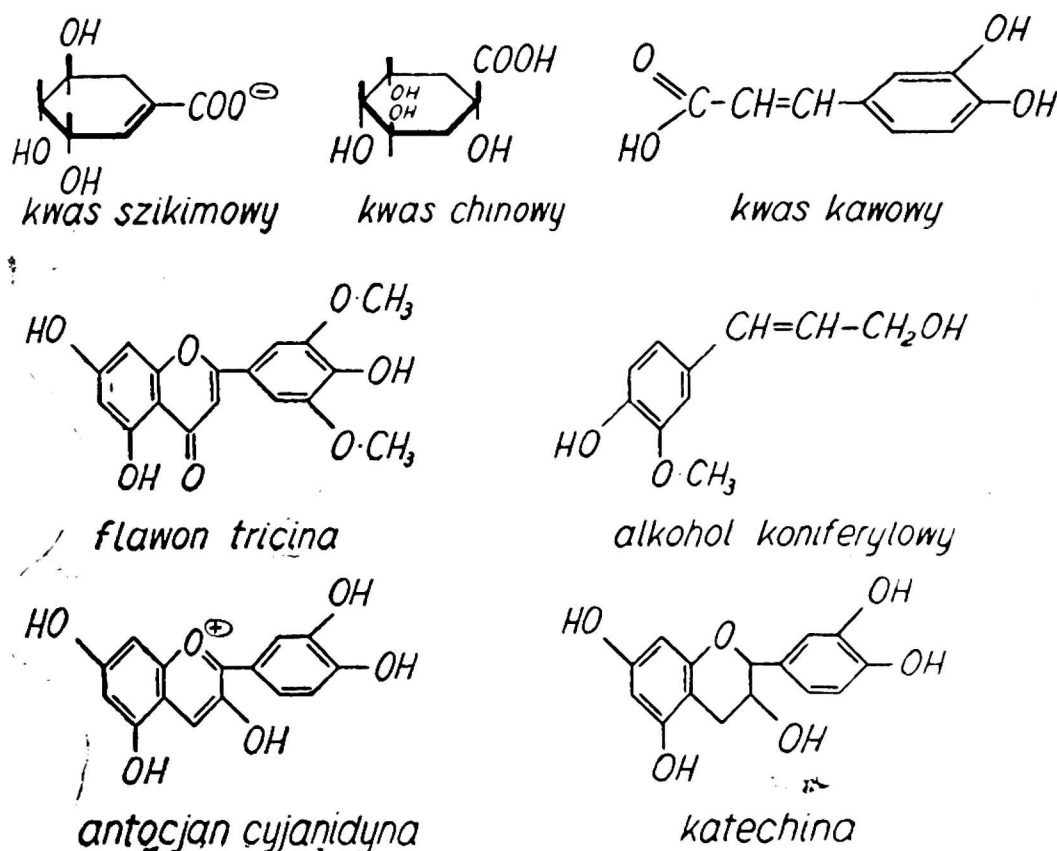
i zwierząt. Jak wiadomo, sekwencję aminokwasów w białkach determinuje odpowiednia sekwencja nukleotydów w DNA. Wiadomo również, że informacje o tej sekwencji są zakodowane w DNA w postaci odpowiedniego ułożenia zasad i następnie przekazywane na m-RNA, który informacje te przenosi do rybosomów, gdzie odbywa się biosynteza białek. A więc przez poznanie sekwencji aminokwasów w białkach można wnioskować o budowie głównego czynnika dziedziczenia — DNA, a co za tym idzie również w miarę możliwości o zakodowanych cechach dziedzicznych (Karlson, 1967). Metody te nie znalazły jeszcze szerokiego zastosowania w badaniach taksonomicznych, gdyż na przeszkodzie stała duża pracochłonność i skomplikowanie. Do oznaczania sekwencji aminokwasów w białku wykorzystuje się metodę opracowaną przez Sangera polegającą na znaczeniu grupy aminowej N-końcowego aminokwasu w łańcuchu peptydowym białka przy pomocy reakcji z dwunitrofluorobenzenem. W wyniku przeprowadzonej następnie hydrolizy otrzymuje się cały szereg wolnych aminokwasów oraz dwunitrofenylową pochodną aminokwasu N-końcowego. Reakcję tę powtarza się aż do kolejnego oddzielenia wszystkich aminokwasów. Widać z tego, jak trudna i długotrwała jest ta metoda. Rysują się perspektywy jej przyspieszenia i udoskonalenia przez zastosowanie automatycznych analizatorów aminokwasów (Alston, 1967; Karlson, 1967).

W badaniach taksonomicznych roślin wykorzystuje się również i inną cechę białek, a mianowicie ich właściwości immunologiczne. Badania te zalicza się jednak nie do chemotaksonomii, lecz do tzw. serotaksonomii (Fairbrothers, 1968).

**Z w i ą z k i f e n o l o w e.** Związki fenolowe stanowią bardzo ważną grupę składników roślinnych. Są one głównymi barwnikami niebieskimi, czerwonymi i fioletowymi roślin. Duże znaczenie mają poza tym jako garbniki, inaczej zwane taninami. Niektóre z nich są substancjami toksycznymi dla mikroorganizmów oraz wpływają na wzrost roślin. Wchodzą poza tym w skład tzw. czynnika P lub witaminy P. W swoim składzie posiadają jedną lub więcej grup fenolowych. Do związków tych należą flawonoidy oraz kwasy fenolowe jak kawowy, chlorogenowy czy chinowy. Do grupy tej zaliczamy także alkohol koniferylowy — główny składnik żywicy benzoesowej oraz lignin. Związki fenolowe są syntetyzowane na drodze metabolicznej z udziałem aminokwasów aromatycznych jak fenyloalanina czy tyrozyna, a prekursorem ich jest kwas szikimowy (Alston, 1967; Karlson, 1967).

W badaniach taksonomicznych najbardziej interesującą grupą są flawonoidy. Posiadają one szkielet węglowy  $C_6-C_3-C_6$ , to znaczy jednostka trójwęglowa łączy 2 pierścienie aromatyczne i zawierają po kilka

grup -OH. Dzieli się je na 10 podstawowych rodzajów: 1) antocyjany, 2) flawonole, 3) flawony, 4) flawanonole, 5) flawanony, 6) katechiny, 7) leukoantocyjany, 8) izoflawony, 9) chalkony, 10) aurony. Najważniejszymi z nich są antocyjany będące podstawowymi barwnikami czerwonymi, nie-



Rys. 2. Typy związków fenolowych występujących w zbożach (Hegnauer, 1963, Karlson, 1967). Związki fenolowe stanowią bardzo ważną grupę składników chemicznych zbóż dla badań taksonomicznych i stosowano je między innymi w systematyce rodzaju *Secale*

bieskimi i fioletowymi wszystkich roślin. Występują one zwykle w połączeniu z cukrami jako tzw. glikozydy, natomiast w formie wolnej tzw. aglikonu rzadko się je spotyka. Flawonole i flawony są barwnikami jasnożółtymi, chalkony — żółtymi, a aurony — pomarańczowymi. W skład garbników wchodzi katechiny i leukoantocyjany oraz wymienione poprzednio kwasy fenolowe (Alston, 1967).

Związki fenolowe znalazły już dość szerokie zastosowanie w chemotaksonomii roślin, co wynika z ich właściwości. Odznaczają się one bowiem różnorodnością strukturalną i względną stabilnością chemiczną. Oprócz tego są szeroko rozpowszechnione w królestwie roślin i dają się stosunkowo łatwo i szybko oznaczać (Harborne, 1968). Oznacza się je metodami chromatografii bibułowej i cienkowarstwowej. Dzięki wprowadzeniu metody magnetycznego rezonansu jądrowego można również precyzyjnie określać ich strukturę (Mabry, 1969).



Związki fenolowe zostały zastosowane również do badań chemotaksonomicznych roślin zbożowych. Pierwszą pracę w tym zakresie wykonał Fröst (1966). Badał on rozmieszczenie związków fenolowych w 18 populacjach pochodzących od diploidalnego żyta odmiany Steel. Związki te ekstrahował on z młodych siewek przy pomocy alkoholu metylowego i rozdzielał następnie metodą chromatografii cienkowarstwowej dwukierunkowej na nośniku celulozowym. Metoda ta została opracowana przez Nyboma (1964) do oznaczania barwników antocyjanowych. Fröst zauważył, że w liniach wsobnych są większe różnice w ilości otrzymanych na chromatogramach plam niż w populacjach. Doszedł on także do wniosku, że stwierdzone różnice są jedynie uwarunkowane genetycznie, przy czym trzeba tu uwzględnić różne warunki środowiskowe.

Tabela 1

Podział gatunków w rodzaju *Secale* według klasyfikacji  
Nürnberga – Krügera

Sekcje:	<i>Kuprijanovia</i>	<i>Cerealia</i>	<i>Silvestria</i>
Gatunki:	<i>S. africanum</i> <i>S. dalmaticum</i> <i>S. kuprijanovii</i> <i>S. vavilovii</i> <i>S. montanum</i>	<i>S. cereale</i> <i>S. dighoricum</i> <i>S. segetale</i>	<i>S. silvestre</i> <i>S. anatolicum</i> <i>S. fragile</i>

Znacznie szersze badania chemotaksonomiczne nad rodzajem *Secale* z wykorzystaniem związków fenolowych prowadzili Dedio, Kaltsikes i Larter (1969 a) z Uniwersytetu Manitoba. Stosowali oni zmodyfikowaną metodę podaną przez Frösta i oznaczali metodą chromatografii cienkowarstwowej dwukierunkowej na celulozie MN-300 ekstrakty metanolowe z młodych liści 11 gatunków *Secale*. Wykryli oni 50 różnych związków fenolowych, przy czym 9 z nich występowało w dużych ilościach we wszystkich gatunkach. Według klasyfikacji Nürnberga-Krügera (1961) badane gatunki zalicza się do 3 sekcji: *Kuprijanovia*, *Cerealia* i *Silvestria*.

Uzyskane przez nich wyniki badań pozwoliły na wyciągnięcie wielu bardzo interesujących wniosków taksonomicznych. Na przykład *S. africanum* ma nieco inny chromatogram niż pozostałe gatunki z sekcji *Kuprijanovia*, różniący się mniejszą ilością plam. Wydaje się, że powodem tego była izolacja *S. africanum* w Afryce, na skutek czego straciło ono zdolność do syntezy brakujących związków. Inne gatunki z sekcji *Kuprijanovia*, a mianowicie *S. dalmaticum*, *S. montanum* i *S. kuprijanovii* zawierały podobną ilość związków fenolowych i jedynie u *S. kuprijanovii*

brak było dwóch żółtych barwników. Okazało się również, że *S. anatolicum* z sekcji *Silvestria* jest bardzo podobne pod względem chromatogramów związków fenolowych do gatunków z sekcji *Cerealia*. Natomiast *S. fragile* uważane za synonim *S. silvestre* miało zupełnie inny chromatogram, zbliżony raczej do chromatogramów uzyskanych w sekcji *Kuprijanovia*. Wszystkie trzy gatunki z sekcji *Cerealia* charakteryzowały się bardzo podobną zawartością związków fenolowych, lecz nie było to niespodzianką, gdyż zarówno *S. segetale*, jak i *S. dighoricum* uważane są za podgatunki *S. cereale*. *S. silvestre*, mimo iż jest zbliżone morfologicznie do sekcji *Kuprijanovia*, wykazało zupełnie inny skład jakościowy związków fenolowych. Występowanie w tym gatunku związków o dużych wartościach  $R_f$  sugeruje, że był on przodkiem sekcji *Cerealia*. Stopień podobieństwa pomiędzy poszczególnymi sekcjami był różny. O wiele większe podobieństwo dawało się zauważyć pomiędzy sekcjami *Silvestria* i *Cerealia*, niż *Cerealia* i *Kuprijanovia*. Mały stopień podobieństwa w tych badaniach między sekcjami *Silvestria* i *Kuprijanovia* sugerować może, że grupy te oddzieliły się od siebie bardzo wcześnie w historii ewolucyjnej.

Dedio, Kaltsikes i Larter (1969 b) tymi samymi metodami badali również okta- i heksaploidalne mieszańce *Triticale* i ich rodziców. Rodzicami form oktaploidalnych *Triticale* oznaczonych jako 8A były pszenice *Triticum aestivum* odmian Chinese Spring, Kharkov i Prelude oraz żyta *Secale cereale* L. odmian Prolific i Dakold. Te same odmiany żyta oraz pszenica *T. turgidum* L. var. *durum* Stewart były rodzicami heksaploidalnych *Triticale* 6A. Obie odmiany żyta zawierały o wiele mniej związków fenolowych niż wszystkie pszenice i *Triticale*. Odmiany pszenic Prelude i Kharkov posiadały identyczne chromatogramy, podczas gdy odmiana Chinese Spring wyraźnie się od nich różniła, natomiast pszenica Stewart miała pośredni chromatogram pomiędzy odmianami Prelude i Kharkov oraz Chinese Spring. Z badań nad *Triticale* wynika, że pomiędzy nimi a ich pszenicami — rodzicami istnieje bardzo ścisłe podobieństwo, jednak jest ono wyraźnie większe dla pszenic heksaploidalnych niż tetraploidalnych. Badacze ci stwierdzili generalnie, że ilość związków fenolowych, a zwłaszcza flawonoidów, wzrasta wraz z poziomem ploidalności, jednak w sposób nieproporcjonalny do ilości genomów. Stwierdzili oni również, że efekt rodzicielski *Secale* jest jakby przysłonięty przez *Triticum*, co jest związane z ilością wprowadzonych genów. Kaltsikes i Dedio (1970) badali również tymi samymi metodami diplo- i poliploidalne gatunki *Aegilops*.

Jak widać z tego, badania chemotaksonomiczne bardzo istotnie uzupełniają badania morfologiczne i cytogenetyczne, a nawet pozwalają na ich korygowanie.

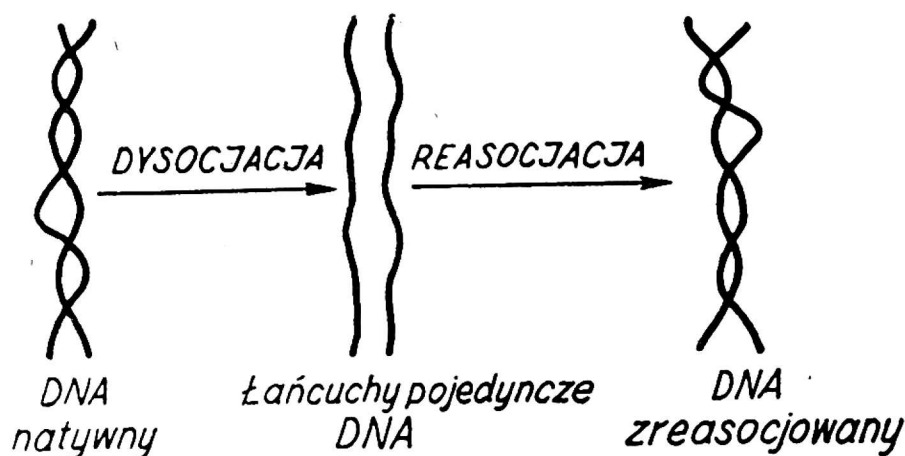
**K w a s y n u k l e i n o w e.** Kwasy nukleinowe, jak wiadomo, są głównymi czynnikami dziedziczenia, to jest przenoszą informacje dziedziczne, a następnie pośredniczą w ich wykorzystywaniu. Z tych też powodów w badaniach chemotaksonomicznych zainteresowano się również kwasami nukleinowymi, a zwłaszcza DNA. Do tego celu opracowane zostały metody tzw. hybrydyzacji DNA. Dla wyjaśnienia ich sedna należy przypomnieć budowę DNA. Z ogólnie znanego modelu Watsona i Cricka wiemy, że DNA składa się z dwóch skręconych ze sobą spiralnie łańcuchów zbudowanych z nukleotydów. Wiemy również, że w skład reszt nukleotydów oprócz cukru dezoksyrybozy z resztą fosforanową wchodzi odpowiednie zasady purynowe lub pirymidynowe, a mianowicie adenina, guanina, cytozyna lub tymina. Zasady te zwrócone są do środka spirali DNA, przy czym odpowiednie zasady, tzw. komplementarne występują zawsze naprzeciw siebie i łączą się przy pomocy wiązań wodorowych. Jeśli spiralę DNA rozdzielimy na pojedyncze łańcuchy na drodze tzw. dysocjacji, a następnie przeprowadzimy proces odwrotny — tzw. reasocjację, to takie ponowne łączenie się łańcuchów polinukleotydowych nosi nazwę hybrydyzacji. Hybrydyzacji możemy poddawać łańcuchy pochodzące z dwóch różnych cząsteczek DNA, jednak zjawisko to może zachodzić jedynie w przypadku odpowiednio komplementarnej budowy obu łańcuchów. Chodzi tu oczywiście o odpowiednie ułożenie zasad (Karlson, 1967).

Kohne (1968) opisał metodę hybrydyzacji DNA w zastosowaniu do taksonomii. Jak już zostało poprzednio stwierdzone, zdolność do hybrydyzacji związana jest z odpowiednią budową DNA, a co za tym idzie ze stopniem pokrewieństwa obu łańcuchów poddawanych temu procesowi. Jeśli bowiem hybrydyzacji poddamy łańcuchy DNA pochodzące z dwóch różnych organizmów, to ilość zreasocjowanego DNA jest wskaźnikiem stopnia ich pokrewieństwa genetycznego.

Praktyczne wykonanie badań metodą hybrydyzacji wygląda następująco. Najpierw DNA z jakiegoś gatunku A rozdziela się na pojedyncze łańcuchy przez ogrzanie do  $100^{\circ}$  i szybkie schłodzenie, a następnie w stężeniu odpowiednio wysokim poddaje się je reasocjacji z małą ilością zdysocjowanego DNA z innego gatunku B, który jest oznaczony izotopem promieniotwórczym. Stwarza się im korzystne warunki do hybrydyzacji, po czym oddziela się łańcuchy pojedyncze od podwójnych. Efekt ten uzyskujemy dzięki przepuszczeniu całej mieszaniny przez kolumnę wypełnioną hydroksypatytem, na której są absorbowane łańcuchy podwójne DNA, a pojedyncze przez nią przechodzą. Pokrewieństwo obu gatunków określa się przy pomocy pomiaru stopnia radioaktywności frakcji zreasocjowanej lub ubytku radioaktywności frakcji zdysocjowanej.



Metoda ta została udoskonalona i trzej badacze Hoyer, McCarthy i Bolton (1964) zastosowali ją do badań systematycznych wirusów, bakterii i zwierząt. Metoda ich nosi nazwę techniki DNA-agar, gdyż pojedyncze łańcuchy DNA unieruchamia się tutaj przy pomocy agaru. Z kolei



Rys. 3. Schemat procesu hybrydyzacji DNA (według Kohne'a, 1968). Zdolność do hybrydyzacji DNA związana jest z odpowiednio komplementarną budową obu łańcuchów. Budowa ta mówi nam o stopniu pokrewieństwa organizmów, z których oba łańcuchy pochodzą. Metody oparte na hybrydyzacji DNA wykorzystano także do badania pokrewieństwa genetycznego podstawowych zbóż: żyta, pszenicy i jęczmienia

DNA z innego gatunku dzieli się poprzecznie na małe fragmenty, wywołuje ich dysocjację, a następnie umożliwia się im hybrydyzację z łańcuchami DNA unieruchomionego w agarze. Fragmenty o budowie komplementarnej łączą się z łańcuchem DNA i pozostają wraz z nim w agarze, a pozostałe fragmenty wymywa się. Tutaj oczywiście też używa się fragmentów DNA znaczonego radioaktywnym izotopem  $^{32}\text{P}$ . Procent homologiczności, czyli pokrewieństwa obu badanych gatunków oblicza się ze wzoru:

$$\% \text{ homolog.} = \frac{W-X}{W-Y} \cdot 100 \%$$

gdzie poszczególne współczynniki oznaczają:

- W — % przyłączonego DNA (naznaczonego  $^{32}\text{P}$ ) do DNA w agarze,
- X — % przyłączonego DNA (naznaczonego  $^{32}\text{P}$ ) do DNA w agarze w obecności  $n \mu\text{g}$  heterogenicznego nieznanego DNA,
- Y — % przyłączonego DNA (naznaczonego  $^{32}\text{P}$ ) do DNA w agarze w obecności  $n \mu\text{g}$  homologicznego nieznanego DNA.

Z techniki hybrydyzacji DNA-agar nie korzystano w badaniach taksonomicznych roślin wyższych z powodu braku odpowiednich metod pozwalających na wyizolowanie wysokocząsteczkowego DNA z komórki roślinnej. Dopiero Bendich i Bolton (1967) udoskonaliли i zmodyfikowali tę metodę, co pozwoliło na zastosowanie jej w badaniach roślin. Badacze ci określali metodą hybrydyzacji DNA i techniką agarową wzajemne pokrewieństwo genetyczne kilku rodzajów zbóż, których przedstawicielami były żyto *Secale cereale var. Rosen*, pszenice *Triticum vulgare var. Seneca* i *var. Chinese Spring* oraz jęczmień *Hordeum bulbosum var. Betznes*. Okazało się, że na przykład pszenica i żyto są bliżej ze sobą spokrewnione niż żyto i jęczmień. W poniższej tabelce są podane wybrane wyniki tych badań:

Rys. 5 obrazuje schemat hybrydyzacji różnych DNA. Wydaje się, że pomimo swej skomplikowości, metody hybrydyzacji DNA zostaną bardzo rozpowszechnione w laboratoriach taksonomicznych, na co wskazuje ważność, dokładność i powtarzalność wyników uzyskiwanych przy ich pomocy.

W badaniach taksonomicznych roślin został również wykorzystany rybosomowy RNA. Pollard (1964) porównywał budowę rybosomowych RNA z różnych gatunków roślin uprawnych i stwierdził, że budowa ich jest wyraźnie różna i charakterystyczna dla każdego gatunku.

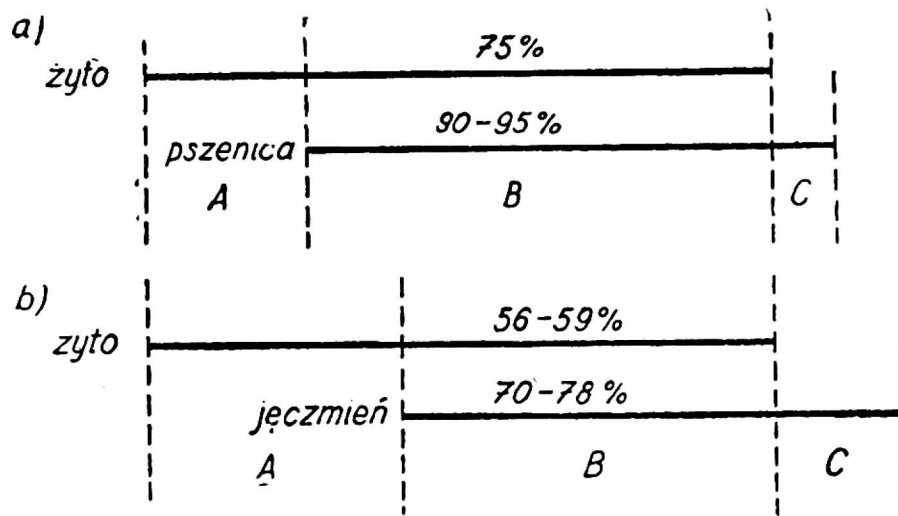
**P o l i s a c h a r y d y.** Polisacharydy, inaczej zwane także glikanami, należą do składników zapasonośnych roślin i składają się w zasadzie z długich łańcuchów złożonych z reszt cukrów prostych. Najważniejsze polisacharydy roślinne to: skrobia, celuloza, inulina, fruktozany i pektyny.

Tabela 2

## Wzajemne pokrewieństwo genetyczne

Pochodzenie DNA w agarze	Pochodzenie DNA znaczonego izotopem <sup>32</sup> P	% homologiczności
A) <i>Secale cereale</i>	<i>Hordeum bulbosum</i>	59,56
	<i>T. vulgare var. Seneca</i>	75
	<i>T. vulgare var. Chinese Spring</i>	74
B) <i>Hordeum bulbosum</i>	<i>Secale cereale</i>	70,78
	<i>T. vulgare var. Seneca</i>	73
C) <i>T. vulgare var. Seneca</i>	<i>Hordeum bulbosum</i>	85
	<i>Secale cereale</i>	95,90

Smith (1968) zajął się klasyfikacją różnych traw na podstawie rodzaju akumulowanej przez nie substancji. Według badań de Cugnaca w 15 rodzajach traw podstawową odkładaną substancją jest skrobia, a w innych



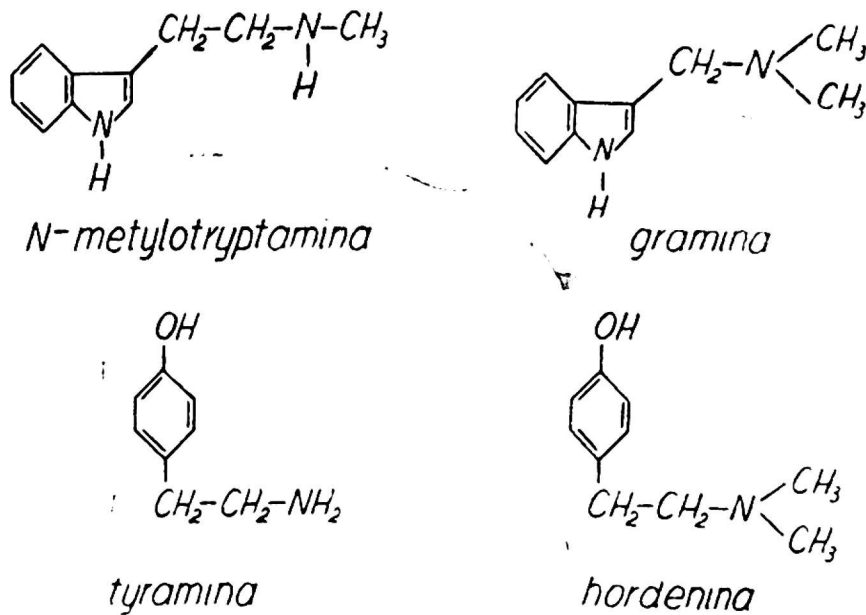
Rys. 4. Hybrydyzacja DNA pochodzącego z różnych zbóż (według Bendicha i Boltona, 1967). a) hybrydyzacja DNA żyta i pszenicy, b) hybrydyzacja DNA żyta i jęczmienia. Linie grube oznaczają łańcuchy polinukleotydowe DNA. A, C — części łańcuchów o różnej, niedopełniającej sekwencji nukleotydów, B — części łańcuchów DNA o budowie wzajemnie komplementarnej i ulegające hybrydyzacji na tym odcinku

23 — fruktozan. Uważa on, że fruktozany są główną substancją zapasową w trawach pochodzących ze strefy umiarkowanej, a skrobia — w trawach ze strefy tropikalnej lub subtropikalnej. Smith oznaczał w trawach pochodzących z Wisconsin i Dakoty przeważający, zapasonośny polisacharyd. Stwierdził on, że skrobia była podstawowym polisacharydem w podrodzinach *Paniceae*, *Andropogoneae*, *Oryzeae*, *Maydeae*, *Aeluropideae*, *Eragrostegae*, *Spartineae*. W podrodzinie *Hordeae* główną substancją zapasową były fruktozany krótkołańcuchowe, a zaś w podrodzinach *Aveneae* — fruktozany o długich łańcuchach. Natomiast w podrodzinie *Festuceae* występowały oba typy fruktozanów.

Badania te dotyczyły traw, które są jednak bardzo spokrewnione ze zbożami i należą do tej samej rodziny *Gramineae*.

Inne związki. Oprócz omówionych grup związków, w chemotaksonomii zbóż z innych w zasadzie nie korzystano. Rysuje się jednak możliwość włączenia do tych badań także i innych chemicznych składników zbożowych. Dotyczy to zwłaszcza aminokwasów niebiałkowych, które stosuje się w badaniach taksonomicznych rodzajów *Lathyrus* i *Vicia*. Wydaje się, że należy zwrócić uwagę na alkaloidy, ponieważ ze zbóż wyizolowana została dość duża ich ilość. Zboża zawierają głównie alkaloidy typu protoalkaloidów, tzn. z atomem azotu nie wbudowanym





Rys. 5. Niektóre alkaloidy występujące w zbożach (Hegnauer, 1963). Dla zbóż charakterystyczne są tzw. protoalkaloidy, to jest z atomem azotu nie wbudowanym w pierścień

w pierścieniu, jak tyramina, *N*-metylotryptamina, hordenina. W rodzinie *Gramineae* charakterystycznym alkaloidem jest również gramina (Hegnauer, 1963).

W zbożach wykryto również szereg innych specyficznych związków. Na przykład w *Sorghum* znaleziono związek cyjanowy — durrinę, a w *Avena sativa* — należąca do saponin rosaponinę. W roślinach zbożowych spotyka się także specjalne sterydy i terpeny, jak miliacyna — w *Panicum*, oryzanole A i B — w *Oryza sativa*, czy dwuhydrosteryn — w *Triticum sativum*. Anderson wyizolował z *Triticum dicoccum* charakterystyczny flawonoid — tricinę (Hegnauer, 1963).

#### LITERATURA

1. Alston R. E. 1967.: Biochemical Systematics, w T. Dobzhansky, M. K. Hecht, W. C. Steere (eds.) — Evolutionary Biology, Vol I, North Holland, Amsterdam, 197—305.
2. Barber J. T., Wood H. L., Steward F. C. 1967.: The separation of the proteins of the wheat by acrylamide gel electrophoresis with special reference to mottled and unmottled wheat, *Can. J. Bot.*, 45: 5—19.
3. Bendich A. J., Bolton E. T. 1967.: Relatedness among plants as measured by the DNA-agar technique, *Plant Physiol.*, 42: 959—967.
4. Boulter D., Thurman D. A., Turner B. L. 1966.: The use of disc electrophoresis of plant proteins in systematics, *Taxon*, 15: 135—143.
5. Boulter D., Thurman D. A. 1968.: Acrylamide Gel Electrophoresis of Proteins in Plant Systematics, w J. G. Hawkes (ed.) — Chemotaxonomy and Serotaxonomy, Academic Press, London & New York, 39—48.

6. Coulson C. B., Sim A. K. 1964.: Proteins of various species of wheat and closely related genera and their relationship to genetical characteristics, *Nature*, 202: 1305—1308.
7. Dedio W., Kaltsikes P. J., Larter E. N. 1969a.: Numerical chemotaxonomy in the genus *Secale*, *Can. J. Bot.*, 47: 1175—1180.
8. Dedio W., Kaltsikes P. J., Larter E. N. 1969b.: A thin — layer chromatographic study of the phenolics of *Triticale* and its parental species, *Can. J. Bot.*, 47: 1589—1593.
9. Erdtman H. 1963.: Some Aspects of Chemotaxonomy, w T. Swain (ed.) — *Chemical Plant Taxonomy*, Academic Press, London & New York, 89—123.
10. Erdtman H. 1968.: The Assessment of Biochemical Techniques in Plant Taxonomy, w J. G. Hawkes (ed.) — *Chemotaxonomy and Serotaxonomy*, Academic Press, London & New York, 235—268.
11. Erdtman H. 1969.: Recent Development in Molecular Taxonomy, w J. B. Harborne, T. Swain (eds.) — *Perspectives in Phytochemistry*, Academic Press, London & New York, 107—120.
12. Fairbrothers D. E. 1968.: Chemosystematics with Emphasis on Systematic Serology, w V. H. Heywood (ed.) — *Modern Methods in Plant Taxonomy*, Academic Press, London & New York, 141—173.
13. Flück H. 1963.: Intrinsic and Extrinsic Factors Affecting the Production of Secondary Plant Products, w T. Swain (ed.) — *Chemical Plant Taxonomy*, Academic Press, London & New York, 167—184.
14. Fröst S. 1966.: Variation of phenolic compounds in different inbred lines of rye, *Hereditas*, 55: 68—72.
15. Gibbs R. D. 1963.: History of Chemical Taxonomy, w T. Swain (ed.) — *Chemical Plant Taxonomy*, Academic Press, London & New York, 41—81.
16. Harborne J. B. 1968.: The Use of Secondary Chemical Characters in the Systematics of Higher Plants, w J. G. Hawkes (ed.) — *Chemotaxonomy and Serotaxonomy*, Academic Press, London & New York, 173—192.
17. Hegnauer R. 1963.: *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Band II. *Monocotyledoneae*, Birkhäuser, Basel, 156—227.
18. Heslop — Harrison J. 1963.: Species Concepts: Theoretical and Practical Aspects, w T. Swain (ed.) — *Chemical Plant Taxonomy*, Academic Press, London & New York, 17—39.
19. Hoyer B. H., McCarthy B. J., Bolton E. T. 1964.: A molecular approach in the systematics of higher organisms, *Science*, 144: 959—967.
20. Jankowski S. 1967.: *Zarys technologii zbóż i strączkowych jadalnych*, cz. 2, PWN, W-wa, 39—50.
21. Johnson B. L., Hall D. 1966.: Electrophoretic studies of species relationship in *Triticum*, *Acta Agricult. Scand. suppl.*, 16: 222—224.
22. Kaltsikes P. J., Dedio W. 1970.: A thin-layer chromatographic study of the phenolics of the genus *Aegilops*, *Can. J. Bot.*, 48: 1778—1786.
23. Karlson P. 1967.: *Zarys biochemii*, PWN, W-wa, 138—155, 317—319.
24. Kohne D. E. 1968.: Taxonomic Applications of DNA Hybridization Techniques, w J. G. Hawkes (ed.) — *Chemotaxonomy and Serotaxonomy*, Academic Press, London & New York, 117—130.
25. Konariw W. G. 1969.: Zjein mutanta kukuruzy Opak — 2 i wozmożnosti wyjawljenija mutantnowo giena w gibridach, *Dokł. Akad. Sjsk. Nauk*, 9: 28—29.

26. Mabry T. J. 1969.: The Ultraviolet and Nuclear Magnetic Resonance Analysis of Flavonoids, w J. B. Harborne, T. Swain (eds.) — Perspectives in Phytochemistry, Academic Press, London & New York, 1—45.
27. Nürnberg — Krüger U. 1960.: Cytogenetische Untersuchungen der Gattung *Secale*, Z. Pflanzenzucht, 44: 63—72.
28. Nybom N. 1964.: Thin — layer chromatographic analysis of Anthocyanidins, *Physiol. Plantarum*, 17: 157—164.
29. Pollard C. J. 1964.: The specificity of ribosomal ribonucleic acid of plants, *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 17: 171—176.
30. Smith D. 1968.: Classification of several native North American grasses as starch or fructosan accumulators in relation to taxonomy, *J. Brit. Grassland Soc.*, 23: 306—309.