

HALINA SKOCZEK  
*Akademia Rolnicza w Poznaniu*

## BADANIA IZOENZYMÓW ROŚLINNYCH

Termin izoenzym jest powszechnie znany od wielu lat. Został wprowadzony po raz pierwszy przez Markerta i Mollera w 1959 roku w odniesieniu do wielu molekularnych form enzymatycznych, które reagują z podobnymi lub identycznymi substratami [41]. Mimo że izoenzymy katalizują tę samą reakcję enzymatyczną różnią się wieloma właściwościami fizykochemicznymi. Niektóre różnice na przykład w wielkości ładunku elektrycznego, czy też w wielkości ciężaru cząsteczkowego wykorzystano do rozdzielania izoenzymów i określenia ilości form molekularnych poszczególnych enzymów.

Występowanie izoenzymów w roślinach jest powszechne. Dokładnego zestawienia przebadanych układów izoenzymatycznych w różnych roślinach dokonał Scandalios [41]. Ilość izoenzymów i poziom aktywności enzymatycznej nie są wielkością stałą w poszczególnych komórkach roślinnych, lecz są to wielkości zmienne zarówno w różnych zespołach komórek ciała rośliny w określonej fazie rozwoju, jak też w ciągu całego cyklu rozwojowego rośliny. Ponadto istnieją zdecydowane różnice w profilach enzymatycznych między poszczególnymi odmianami tych samych gatunków roślin [31, 50].

Nie jest znany dokładny mechanizm, za pomocą którego komórki wyższych organizmów roślinnych regulują ilość i jakość makromolekuł podczas cyklu rozwojowego. Zmiany w poziomie aktywności enzymów mogą być spowodowane zróżnicowaną transkrypcją, aktywacją, degradacją, inhibicją czy akumulacją białek enzymatycznych. Aktywność enzymów w różnych tkankach zależy zarówno od dojrzałości i warunków fizykochemicznych komórek jak też od środowiska zewnętrznego. Ze względu na to, że enzymy uczestniczą w większości reakcji zachodzących w organizmach żywych, pojawienie się lub zanikanie form izoenzymatycznych pod wpływem zmiennych czynników zewnętrznych i wewnętrznych może być ważnym wskaźnikiem dla badaczy w rozwiązywaniu problemów biologicznych dotyczących: fizjologii rozwoju, odporności na choroby, wpływie warunków zewnętrznych na metabolizm rośliny itp. Izoenzymy coraz częściej znajdują zastosowanie w śledzeniu działania ge-

nów roślinnych [18, 19, 20], a wynika to z udowodnionej zależności między genami a enzymami.

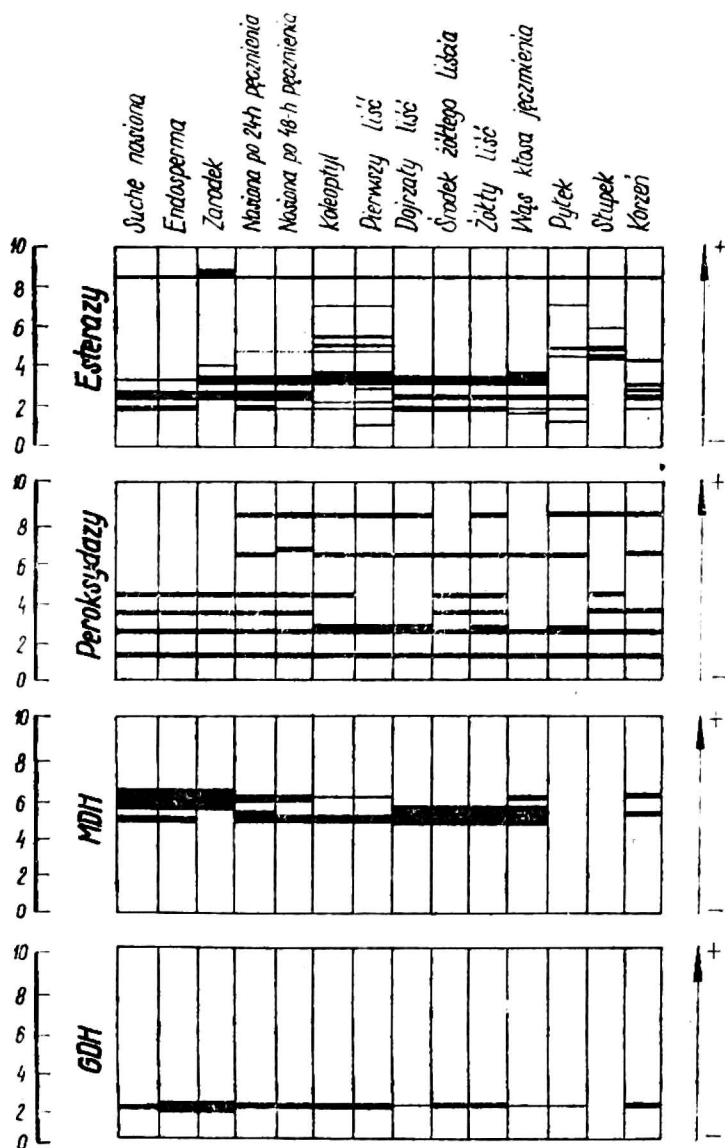
Istniejącą zależność, na przykład między intensywnością wzrostu organów różnych odmian danego gatunku a aktywnością izoenzymów i ich profilami izoenzymatycznymi można wykorzystać do wyselekcjonowania odmian najkorzystniejszych dla hodowcy.

Ze względu na dużą przydatność badań izoenzymów roślinnych wydaje się celowe omówienie głównych kierunków tych badań.

### *Występowanie izoenzymów podczas rozwoju roślin*

Badanie aktywności enzymów i śledzenie spektrum izoenzymów podczas rozwoju roślin dostarcza wiele danych potrzebnych do zrozumienia mechanizmów różnicowania komórkowego i kształtowania ciała rośliny.

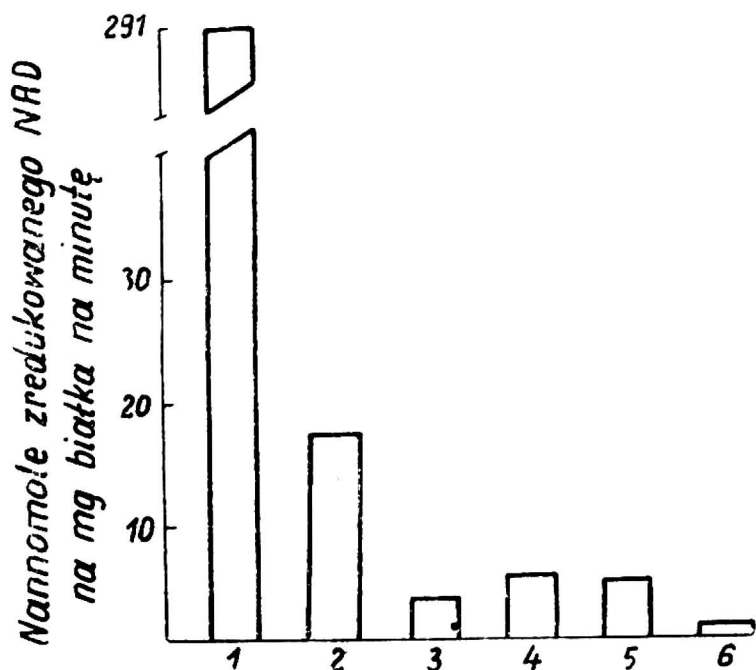
Związek między różnicowaniem a zmianami w spektrum izoenzymów zaobserwowano wielokrotnie w szeregu organizmach roślinnych dla różnych układów izoenzymatycznych. Przytoczenie kilku przykładów ma na celu zapoznanie z ogromnymi możliwościami badań w tym kierunku.



Rys. 1 Zymogramy izoenzymów GDH, MDH, peroksydazy i esterazy obserwowane w suchych nasionach, podczas kiełkowania oraz w czasie różnicowania organów jęczmienia

Mitra [31] stwierdził różnice w spektrum izoenzymów dehydrogenazy glutaminianowej (GDH), dehydrogenazy jabłczanej (MDH), peroksydazy i esterazy w rozwoju jęczmienia (rys. 1).

Scandalios [47] badał aktywność i skład izoenzymów dehydrogenazy alkoholowej (ADH) w różnych fazach rozwoju kukurydzy. Analizując endospermę, tarczkę, zarodek, kielek i korzeń stwierdził zmiany w specyficznej aktywności i ilości izoenzymów w badanych organach podczas rozwoju (rys. 2).



Rys. 2. Specyficzna aktywność ADH w różnych organach siewek kukurydzy po 17 dniach kiełkowania (47) 1 — tarczka, 2 — endosperma, 3 — korzeń, 4 — kielek, 5 — koleoptyl, 6 — liść

Jeszcze wcześniej Scandalios [46] zaobserwował zróżnicowane występowanie izoenzymów aminopeptydazy leucynowej (LAP). Tylko izoenzymy LAP-A i LAP-B występowały we wszystkich tkankach w czasie rozwoju, natomiast odmiana LAP-C pojawiła się w endospermie i zarodku a izoenzym LAP-D występował tylko w płynnej endospermie od 11 do 16 dnia po zapyleniu [46]. Przejściowa obecność aminopeptydazy D podczas rozwoju może być dowodem przerywanej aktywności genu kontrolującego pojawienie się LAP-D. Prawdopodobnie ten izoenzym odgrywa szczególną rolę w przestawionym metabolizmie występującym podczas rozwoju endospermy.

Zróżnicowanie w aktywności i profilu izoenzymów podczas rozwoju potwierdziły również badania oksydazy askorbinianowej w kiełkującym grochu [51] i siewkach ogórka [52].

Oksydaza askorbinianowa nie występuje w nasionach grochu lecz pojawia się dopiero podczas kiełkowania. Prześladowano spektrum izoenzymów w ekstraktach z korzeni podczas kiełkowania grochu. W korzeniach zidentyfikowano od 3—7 izoenzymów pojawiających się w czasie kiełkowania [51].

Z uzyskanych danych wynika, że oksydaza askorbinianowa odgrywa waż-

ną rolę w metabolizmie wzrostu rośliny. Wyższa aktywność enzymu jest związana z tą częścią rośliny, gdzie zachodzą intensywne podziały komórkowe.

### *Lokalizacja izoenzymów*

Poza kilku wyjątkami wszystkie komórki somatyczne organizmów wielokomórkowych posiadają ten sam garnitur chromosomów, a jednak w różnych tkankach skład enzymów jest odmienny i zmienia się często w czasie rozwoju [15].

Zróznicowane występowanie układów izoenzymatycznych dotyczy różnic w profilu izoenzymów określonego enzymu oraz aktywności poszczególnych izoenzymów. Według Scandaliosa [41] w rozmaitych organizmach roślinnych:

1. Różne izoenzymy występują w różnych tkankach danego organizmu [7, 22, 46, 47, 50].
2. Pewne izoenzymy są obecne w tkankach w określonych fazach rozwoju lecz nieobecne w innych fazach [31, 47].
3. Genetycznie identyczne izoenzymy mogą być obecne w zmiennych ilościach [40, 43].

Szczegółowe badania występowania izoenzymów obejmują ich lokalizację subkomórkową. Nie wiadomo jakie czynniki decydują o związaniu izoenzymów z określonymi frakcjami subkomórkowymi. W każdym razie lokalizacja subkomórkowa określonych izoenzymów jest jednym z ważnych etapów w badaniu podstaw mechanizmów różnicowania i kontroli genetycznej procesów metabolicznych. Związanie izoenzymów z rybosomami lub jądrem może wskazywać na możliwość regulacyjnego oddziaływania tych enzymów na syntezę białka roślinnego. Aktywność enzymatyczną umiejscawiano w komórce za pomocą technik cytochemicznych [10, 15, 33]. Na przykład dehydrogenazę bursztynianową zlokalizowano w ten sposób w mitochondriach i plastydach [57].

Następny etap obejmuje izolację poszczególnych organelli, z którymi jest związany dany enzym i identyfikację izoenzymów [8, 13, 43, 55]. Izolację przeprowadzono metodami wirowania różnicowego i określone frakcje oczyszczano techniką wirowania w gradiencie stężeń sacharozy [6, 25, 43].

W szczegółowych badaniach dehydrogenazy jabłczanej w kukurydzy [60] stwierdzono, że istnieją dwie formy rozpuszczalne enzymu, pięć form związanych z mitochondriami i dwie z glyksysomami.

W pracowni Leonarda [24, 25] pięć różnych aktywności adenozyntójfosfatazy zlokalizowano we frakcji mitochondrialnej, w błonach retikulum endoplazmatycznego, aparacie Golgiego oraz w błonach tonoplastowych.

Aktywność peroksydazy i oksydazy IAA znaleziono w ścianach komórkowych [13, 27, 29], we frakcji rybosomalnej [6, 39], mitochondriach [6, 55] oraz jądrach komórkowych [38].

W przypadku kompleksu enzymatycznego oksydazy IAA zlokalizowanej w błonach próbowano określić sposób powiązania enzymu z błoną [58]. Prawdopodobnie kompleksy enzymatyczne łączą się z błoną za pośrednictwem związku polifenolowego, który usuwano za pomocą poliwinylpiperolidonu. Przeprowadzono również dysocjację kompleksu enzymatycznego od błony za pomocą chlorku potasu, chlorku wapnia i mocznika.

### *Wpływ hormonów i regulatorów wzrostu na izoenzymy*

Występowanie izoenzymów w różnych tkankach roślinnych i ich zróżnicowanie w czasie rozwoju rośliny jest uwarunkowane genetycznie, a także zależy od wielu czynników zewnętrznych i wewnętrznych. Znaczną rolę w regulacji występowania izoenzymów odgrywiają hormony i regulatory wzrostu, które mogą indukować lub hamować działanie genów [14, 48].

Modelem do badań wpływu hormonów na enzymy roślinne jest oksydaza IAA i peroksydaza. Wpływ egzogennej IAA na izoenzymy peroksydazy badano w koleoptylach owsa [49]. Odcinki koleoptyli z pięciodniowych roślin umieszczano w roztworach zawierających różne stężenia IAA. Po 20 godzinach inkubacji w ciemności analizowano ilość izoperoksydaz w ekstraktach z wyrosniętych w tym czasie odcinków koleoptyli. Stwierdzono, że jeden izoenzym peroksydazy, który występuje przy stężeniu IAA od 0—1  $\mu\text{g}$  nie pojawia się, gdy zwiększono stężenie auksyny do 10  $\mu\text{g}$ . Natomiast inna izoperoksydaza nieobecna przy stężeniu 0—0,1  $\mu\text{g}$  IAA zjawia się pod wpływem zwiększenia stężenia IAA do 1  $\mu\text{g}$  lub ponad 1  $\mu\text{g}$ . Należy zaznaczyć, że w stosunku do kontroli (brak IAA) 1  $\mu\text{g}$  IAA był optymalny dla wydłużenia koleoptyla, 10  $\mu\text{g}$  IAA supraoptymalne natomiast 100  $\mu\text{g}$  inhibowało wydłużanie.

Doświadczenie powtórzono z syntetycznym hormonem — kwasem 2,4-dwuchlorofenoksyoctowym (2,4-D) i uzyskano podobne wyniki, stąd wnioskowano o istnieniu również innych hormonów z właściwościami auksyn mającymi zdolność do indukcji i represji izoperoksydaz. Prawdopodobnie pewne izoperoksydazy pojawiają się w roślinie w odpowiedzi na zmniejszenie endogennych auksyn.

Nie znaleziono hamowania izoperoksydaz przez auksyny w tytoniu [29], co tłumaczono różnym materiałem roślinnym. Natomiast stwierdzono w tytoniu zarówno stymulację izoperoksydaz przez auksyny jak też przez kwas 2,3,5-trójjodobenzoesowy (TIBA). Jednakże TIBA stymulo-

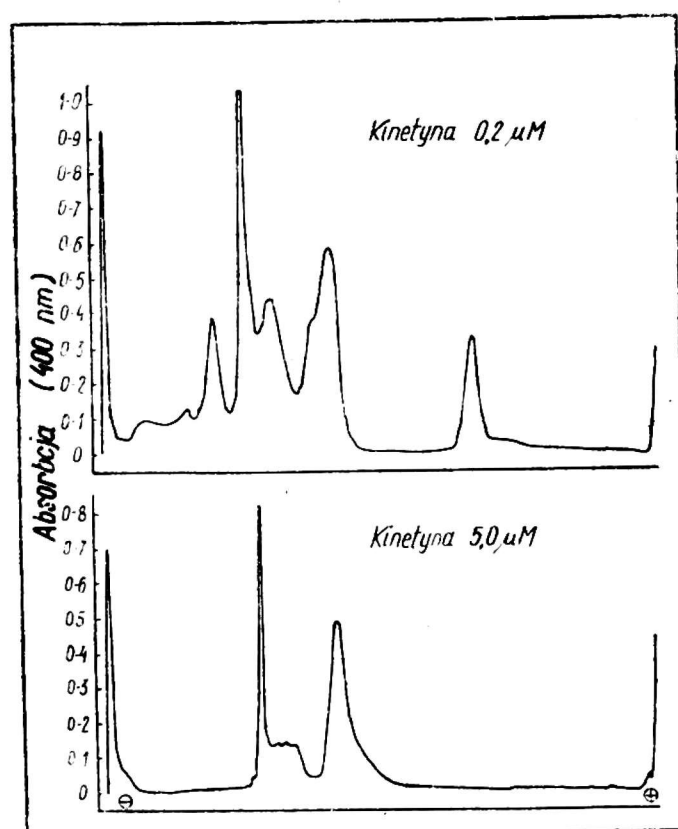
wał tylko aktywność izoperoksydaz we frakcji ścian komórkowych a nie izoperoksydaz frakcji cytoplazmatycznej.

Wpływ kinetyny na izoenzymy peroksydazy i oksydazy IAA badał Lee [23] w tkankach kallusa tytoniu. Analizował wpływ kinetyny na izoenzymy frakcji ścian komórkowych, cytoplazmatycznej, mitochondrialnej, rybosomalnej, jądrowej oraz frakcji błon cytoplazmatycznych. Na podstawie wyników uzyskanych z poprzednich prac przyjął jako standard 0,2  $\mu\text{M}$  kinetyny. Wzrost stężenia kinetyny od 0,2 do 5,0  $\mu\text{M}$  powodował zmniejszenie specyficznej aktywności enzymu oksydazy IAA oraz peroksydazy we wszystkich frakcjach.

Tabela

Wpływ kinetyny na specyficzną aktywność oksydazy IAA we frakcjach subkomórkowych tkanek kallusa tytoniu (23).

Frakcja	Aktywność oksydazy IAA $\mu\text{g}$ rozłożonego IAA / $\mu\text{g}$ białka w 30 min.		
	Kinetyna 0,2 $\mu\text{M}$	Kinetyna 0,1 $\mu\text{M}$	Kinetyna 5,0 $\mu\text{M}$
Ściany komórkowe	29,4	26,8	22,3
Błony plazmatyczne	8,8	6,0	5,7
Jądra	28,9	23,2	24,7
Mitochondria	27,4	19,2	17,5
Rybosomy	27,9	27,2	22,4
Cytoplazma	24,9	17,6	10,9



Rys. 3. Zmiany w profilach izoperoksydaz frakcji rybosomalnej z kallusa tytoniu pod wpływem różnego stężenia kinetyny [23]

Lee [23] zaobserwował również, że pod wpływem wyższego stężenia kinetyny następowały zmiany w profilu izoenzymów. Wzrost stężenia kinetyny inhibował szczególnie wyraźnie tworzenie pewnych izoperoksydaz związanych z frakcją cytoplazmatyczną, rybosomalną i błonami plazmatycznymi (rys. 3).

### *Charakterystyka genetyczna układów izoenzymatycznych*

Istnienie bezpośredniej zależności między genami i enzymami jest faktem udowodnionym w obszernych badaniach głównie nad bakteriami i wirusami [59]. Enzymy jak również białka strukturalne podlegają bezpośredniej kontroli genów. Kiedy białko zawiera więcej niż jeden łańcuch polipeptydowy, wtedy wytwarzanie każdego łańcucha jest kontrolowane przez odrębny gen. Jednakże nie wiadomo dokładnie, czy izoenzymy powstają w następstwie mutacji genów, czy też są wynikiem kombinacji między oligomerami, którymi są najczęściej dwa polipeptydy będące pod kontrolą genów allelowych [30].

Scharakteryzowane pod względem genetycznym układy izoenzymów mogą być przydatne w badaniach dotyczących określenia zakresu kontroli genetycznej nad różnymi procesami zachodzącymi w roślinie. Najczęściej służą rozszyfrowywaniu podstawowych mechanizmów różnicowania komórkowego.

Izoenzymy roślinne są jeszcze słabo zbadane pod względem genetycznym. Pierwsze badania dotyczyły esteraż w endospermie kukurydzy, aminopeptydazy leucynowej, katalazy, amylaz oraz dehydrogenazy alkoholowej [42].

W badaniach genetycznych bardzo ważnym jest posługiwanie się dokładną, wypróbowaną techniką identyfikacji produktów działania genów. Najczęściej do rozdzielania białek enzymatycznych stosowano techniki elektroforetyczne na żelu skrobiowym lub poliakrylamidowym [7, 28, 36]. Przy użyciu tych technik przebadano pod względem genetycznym wiele systemów izoenzymatycznych.

Problem analizy genetycznej enzymów można przedstawić na przykładzie dwóch szczegółowo zbadanych systemów izoenzymatycznych w kukurydzy: katalazy (E.C1.11.1.6) i dehydrogenazy alkoholowej (E.C.1.1.1.1.).

Dokładne badania katalazy [37, 42, 43, 44] wykazały, że cząsteczka tego enzymu składa się z czterech podjednostek białkowych i jest kodowana przez dwa geny  $Ct_1$  i  $Ct_2$ . Gen  $Ct_1$  istnieje w sześciu odmianach allelowych ( $Ct_1^F$ ,  $Ct_1^K$ ,  $Ct_1^M$ ,  $Ct_1^S$ ,  $Ct_1^V$  i  $Ct_1^{V'}$ ). Każdy produkt genu alloloвого jest charakterystyczny dla określonej wsobnej linii homozygotycz-

nej kukurydzy. Krzyżując odmiany posiadające podobne warianty katalazy uzyskiwano potomstwo nie różniące się od rodziców pod względem ruchliwości elektroforetycznej katalazy. Natomiast w wyniku krzyżowania odmian z różnymi wariantami katalazy uzyskiwano w pokoleniu heterozygotycznym  $F_1$  pięć izoenzymów, trzy z nich były mieszańcami enzymatycznymi. Na przykład krzyżując  $Ct^{F^1_1} \times Ct^{V^1_1}$  uzyskiwano w potomstwie  $F_1$  dwa typy rodzicielskie:  $F^4$  i  $V^4$  oraz trzy mieszańce molekularne:  $F^3 V^1$ ,  $F^2 V^2$ ,  $F^1 V^3$  [42].

Działanie dwóch genów katalazy jest zróżnicowane w czasie. Scandalios informuje [37, 44], że produkty genu  $Ct_1$  pojawiają się podczas rozwoju nasion, natomiast produkty genu  $Ct_2$  występują w suchych nasionach a następnie ich ilość wzrasta w pierwszych dniach kiełkowania, gdy tymczasem produkty genu  $Ct_1$  zanikają.







Scandalios [37] badał w tarczках kiełkujących nasion kukurydzy tempo syntezy i degradacji dwu homoterametrów katalazy  $V^4$  i  $Z^4$  określonych przez geny nieallelowe. Oba izoenzymy są syntetyzowane w tym samym czasie, jednakże tempo syntezy  $Z^4$  przewyższa tempo syntezy  $V^4$ , co sugeruje o istnieniu czynnika różnicującego uruchamianie obu genów katalazy.

W badaniach genetycznych dehydrogenazy alkoholowej (ADH) w kukurydzy stwierdzono, że ADH występuje w pięciu odmianach elektroforetycznych ADH-1, ADH-2, ADH-3, ADH-4 i ADH5 [47]. Dokładnie zanalizowano pod względem genetycznym ADH-1 i ADH2 [12, 45]. W oparciu o badania Scandaliosa [45] wiadomo, że każdy z tych izoenzymów występuje w dwóch odmianach: o większej ruchliwości elektroforetycznej ADH-1<sup>F</sup> oraz o mniejszej ruchliwości elektroforetycznej ADH-1<sup>S</sup> i ADH-2<sup>S</sup>. ADH-1 w kukurydzy jest pod kontrolą dwóch genów allelowych bez dominacji  $Adh^{1F}$  i  $Adh^{1S}$ . W wyniku krzyżowania osobników posiadających odmianę ADH-1<sup>F</sup> z osobnikami zawierającymi izoenzymy ADH-1<sup>S</sup> w pokoleniu  $F_1$  pojawia się potomstwo z obu odmianami ADH-1 (F i S). Elektroforetyczne warianty ADH-2 znajdują się również pod kontrolą dwóch działających genów allelowych bez dominacji  $Adh^{2F}$  i  $Adh^{2S}$ . Homozygoty dla allelu  $Adh^{2F}$  posiadają tylko izoenzymy o większej ruchliwości elektroforetycznej, natomiast homozygoty dla allelu  $Adh^{2S}$  mają izoenzymy o mniejszej ruchliwości elektroforetycznej. Heterozygoty posiadają obie odmiany i dodatkowo jeden mieszaniec molekularny [rys. 4].

Izoenzymy ADH-1 i ADH-2 były przedmiotem szczegółowych badań genetycznych również w innych organizmach roślinnych [9, 53, 54].

Dalsze badania genetyczne izoenzymów obejmują lokalizację genów odpowiedzialnych za pojawienie się danego białka enzymatycznego oraz określenie stopnia sprzężenia między różnymi genami [4, 32]. Badano mo-



Genotyp	Fenotyp	Wzór elektroforetyczny
$Adh^{1F}/Adh^{1F}$	$(F^1/F^1)$	
$Adh^{1F}/Adh^{1S}$	$(F^1/S^1)$	
$Adh^{1S}/Adh^{1S}$	$(S^1/S^1)$	
$Adh^{2F}/Adh^{2F}$	$(F^2/F^2)$	
$Adh^{2F}/Adh^{2S}$	$(F^2/S^2)$	
$Adh^{2S}/Adh^{2S}$	$(S^2/S^2)$	

Rys. 4. Zależność między wzorem elektroforetycznym izoenzymów ADH, fenotypem i genotypem [45]

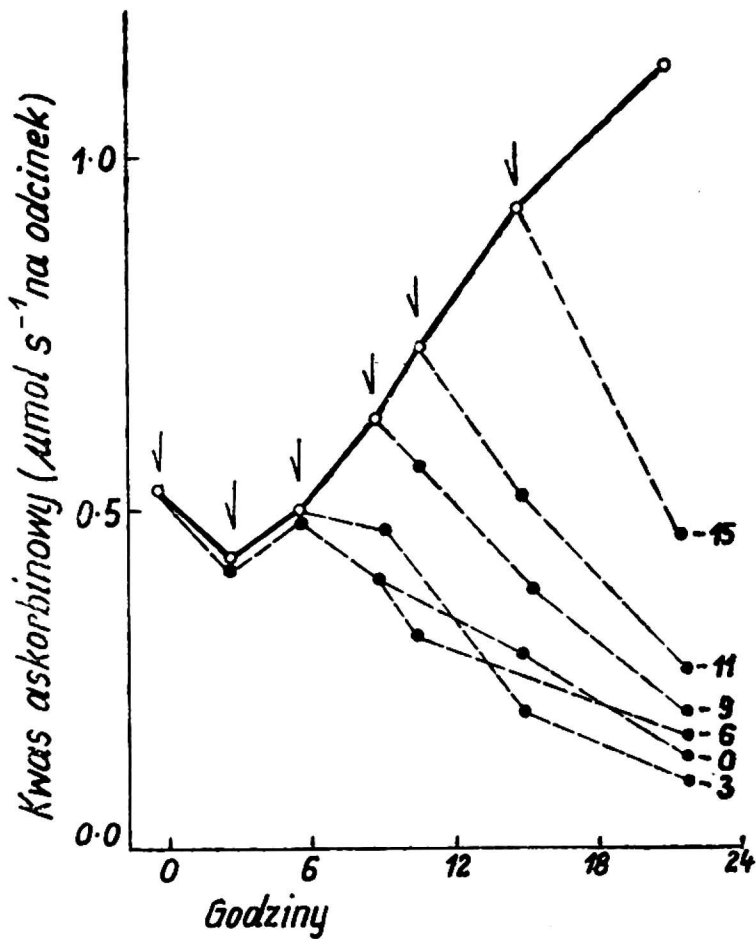
żliwość sprzężenia genetycznego izoenzymów  $\beta$ -amylazy z odpowiednimi innymi genetycznie zdefiniowanymi systemami izoenzymatycznymi w kukurydzy: dehydrogenazy alkoholowej, aminopeptydazy, katalazy oraz kwaśnej fosfatazy. W wyniku badań stwierdzono sprzężenie tylko między genami  $\beta$ -amylazy i katalazy [4].

#### Synteza czy aktywacja prekursorów enzymatycznych

Z analizą genetyczną izoenzymów wiążą się badania, które mają wyjaśnić, czy pojawienie się nowego izoenzymu lub wzrost aktywności istniejącego jest spowodowany jego syntezą czy też aktywacją prekursora enzymatycznego, który został syntetyzowany wcześniej. W celu znalezienia odpowiedzi na to pytanie przeprowadzono szereg doświadczeń z inhibitorami i aktywatorami syntezy białek. Syntezę i tempo formowania enzymu kontrolowano na poziomie transkrypcji lub translacji.

W badaniu izoenzymów oksydazy askorbinianowej (E.C.1.10.33) stwierdzono, że 6-metylopuryna, tiouracyl, cykloheksimid i tioprolina hamują syntezę tego enzymu [51, 52]. Tylko D-chloramfenikol nie wywierał zdecydowanego wpływu na enzym i na tej podstawie sugerowano, że synteza oksydazy askorbinianowej zachodzi na rybosomach cytoplazmatycznych. Podobne wyniki uzyskano podczas badania izoenzymów peroksydazy (E.C.1.11.17) w osiach zarodkowych soczewicy [21] i hypokotylach fasoli [1, 2, 16].

Anzai [1] badał wpływ helianginy — inhibitora syntezy białek na aktywność izoperoksydaz. Odcinki hypokotyli *Phaseolus mungo* umieszczał w wodzie na okres 0, 3, 6, 9, 11 i 15 godzin, a następnie przenosił do roztworu z helianginą o stężeniu  $3 \times 10^{-4} M$ . Na podstawie przeprowadzonego doświadczenia Anzai [1] stwierdził, że heliangina hamowała aktywność peroksydazy w hypokotylach fasoli.



Rys. 5. Wpływ helianginy na aktywność peroksydazy w odcinkach hypocotyli *Phaseolus mungo* (1).

Podobny efekt obniżenia aktywności enzymu uzyskał Anzai [1] z cykloheksamidem. Wyniki badań z inhibitorami dla wymienionych układów izoenzymów sugerują, że w badanych roślinach zachodzi synteza de novo tych molekuł enzymatycznych.

Odmienne wyniki uzyskano w badaniach dehydrogenazy alkoholowej w tarczках kukurydzy podczas kiełkowania nasion [56]. Stwierdzono, że aktywność enzymu po kiełkowaniu pozostaje niezmienną w obecności inhibitora syntezy białek cykloheksamidu lub inhibitora syntezy kwasu rybonukleinowego aktynomycyny, co sugeruje, że kontrola aktywności dehydrogenazy alkoholowej jest niezależna od transkrypcji i translacji. Zakładając brak syntezy de novo molekuł tego enzymu, obserwowany spadek aktywności w ekstraktach z tarczkek nasion kukurydzy podczas kiełkowania wskazuje na pojawienie się substancji hamującej aktywność dehydrogenazy alkoholowej.

#### Właściwości fizykochemiczne indywidualnych izoenzymów

Bardzo ważne miejsce w badaniach izoenzymów roślinnych zajmują prace, których celem jest poznanie fizykochemicznej natury i właściwości indywidualnych izoenzymów. Wyniki uzyskane z tych prac są przydatne

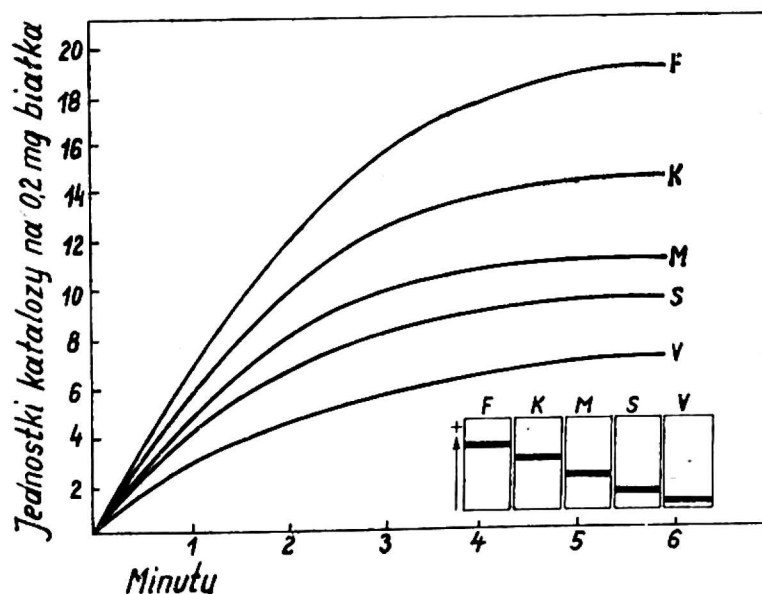
w zrozumieniu udziału poszczególnych izoenzymów w procesach fizjologicznych, biochemicznych oraz ułatwiają poznanie regulacji genetycznej procesów metabolicznych.

Wstępem do badań izoenzymów jest najczęściej dokładne oczyszczenie enzymu [25, 44, 60], które obejmuje kilka etapów. Oczyszczoną w odpowiednim stopniu frakcję enzymatyczną rozdziela się z kolei metodami elektroforetycznymi lub chromatograficznymi i wyodrębnione izoenzymy poddaje szczegółowym badaniom. Badania dotyczą: określenia specyficzności enzymu, stałej Michaelisa, optimum pH, wrażliwości na inhibitory, wpływu aktywatorów, określenia ciężaru cząsteczkowego, punktu izoelektrycznego itp.

Oznaczono specyficzną aktywność, termostabilność i stałą Michaelisa izoenzymów dehydrogenazy alkoholowej w kukurydzy [11, 12]. Obie formy o większej (F) i mniejszej (S) ruchliwości elektroforetycznej izoenzymów ADH-1 i ADH-2 izolowano z homozygotycznych (F/F, S/S) i heterozygotycznych (F/S, S/F) ziaren kukurydzy. Formy F ADH-1 i ADH-2 mają wyższą specyficzną aktywność i większą stabilność temperaturową niż odpowiednie formy S (11). Mieszance izoenzymatyczne izolowane z ziaren heterozygotycznych wykazują mniejszą aktywność katalityczną w porównaniu z formami izoenzymatycznymi ziaren homozygotycznych (F/F). Stąd można wnioskować o mniejszej skuteczności katalitycznej produktu polipeptydowego genu *Adh<sup>S</sup>*.

Podobnie określono właściwości fizykochemiczne izoenzymów katalazy w ziarnach kukurydzy [44]. Produkty genu *Ct<sub>1</sub>* badano w endospermie ziaren w 16—18 dni po zapyleniu, natomiast izoenzymy katalazy kontrolowane przez gen *Ct<sub>2</sub>* badano po czterech dniach kiełkowania nasion kukurydzy w ekstraktach z tarczek. Stwierdzono różnice w aktywności pięciu wariantów allelowych genu *Ct<sub>1</sub>* (rys. 6).

Różnice w aktywności występują również wśród izoenzymów katalazy wyodrębnionych z nasion pokolenia *F<sub>1</sub>* pochodzących z mieszańców między



Rys. 6. Względne aktywności pięciu allelicznych wariantów katalazy (F, K, M, S i V) będących pod kontrolą genu *Ct<sub>1</sub>* (44).

dwu allelami genu  $Ct_1$  ( $Ct^V_1 \times Ct^F_1$ ). Poziom aktywności katalazy w heterozygotach jest wyższy niż w formach rodzicielskich odmian wsobnych. Mieszańce izoenzymatyczne ponadto wykazują mniejszą czułość na inhibicję przez aminotriazol niż formy rodzicielskie.

W przypadku izoenzymów katalazy będących produktami dwóch genów nieallelowych  $Ct_1$  i  $Ct_2$  stwierdzono [44] różnice w punkcie izoelektrycznym, stałej Michaelisa oraz stabilności temperaturowej. Produkty genu  $Ct_1$  ( $V^4$ ) są bardziej labilne, podczas gdy produkty genu  $Ct_2$  ( $Z^4$ ) charakteryzuje znaczna stabilność. Półokres rozpadu w temperaturze  $50^\circ\text{C}$  wynosi dla izoenzymu  $V^4$  6,5 minut natomiast dla izoenzymu  $Z^4$  141 minutę. Różnice we właściwościach między  $V^4$  i  $Z^4$  mogą mieć znaczenie fizjologiczne. Produkty działania genu  $Ct_2$  ujawniają się w czasie rozwoju a więc wówczas, gdy nasilają się procesy metaboliczne.

Ogromne zróżnicowanie we właściwościach fizykochemicznych spotyka się również wśród izoenzymów dehydrogenazy jabłczanowej (E. C. 1, 1, 1, 37). Różnice w aktywności enzymów i we właściwych fizycznych istnieją między izoenzymami związanymi z błonami jak i wolnymi znajdującymi się w cytoplazmie a także między izoenzymami w każdej z tych dwu klas. Prawdopodobnie wszelkie zmiany zachodzące w tkankach podczas rozwoju a dotyczące zmian pH, stężenia jonów metali, substratu i koenzymu mogą mieć wpływ na aktywność dehydrogenazy jabłczanowej (MDH) w kukurydzy. Zaobserwowane hamowanie aktywności izoenzymów MDH substratem i koenzymem może odgrywać pewną rolę w regulowaniu zdolności utleniającej cyklu Krebsa w tkankach kukurydzy [60].

Podobne badania przeprowadzono dla wielu innych układów izoenzymatycznych [3, 5, 24, 25, 34, 35]. Już z przytoczonych przykładów jasno wynika celowość tych badań i ich przydatność w rozwiązywaniu wielu problemów związanych z fizjologią i biochemią roślin.

### *Uwagi końcowe*

Przedstawione w artykule kierunki badań nie wyczerpują tematu, lecz w dostatecznym stopniu pozwalają zorientować się w dużych możliwościach wykorzystania wyników tych badań do zrozumienia mechanizmów różnicowania ciała rośliny.

Badania genetyczne mają na celu określenie ilości genów uwikłanych w produkcję białek izoenzymatycznych, pozwalają stwierdzić ilość podjednostek białkowych budujących izoenzymy a także określają sposób dziedziczenia profili izoenzymów jako specyficznych cech fenotypowych.

Izoenzymy użyte jako wyznaczniki (markery) genetyczne umożliwiają

śledzenie działania genu podczas rozwoju rośliny skuteczniej od markerów morfologicznych, których kształt jest uwarunkowany działaniem całego szeregu genów o różnym stopniu sprzężenia.

Dokładne określenie właściwości fizykochemicznych indywidualnych izoenzymów zlokalizowanych w różnych tkankach i organellach podczas rozwoju rośliny jest warunkiem zrozumienia podstaw mechanizmów różnicowania komórkowego.

Czynniki wewnętrzne (hormony, regulatory wzrostu, zmiany właściwości fizykochemiczne cytoplazmy), zewnętrzne (substancje mineralne w glebie, temperatura, światło) oraz czynniki stressowe (choroby, zranienia) w ogromnym stopniu wpływają bezpośrednio lub pośrednio na działanie genów a więc także na występowanie izoenzymów. Badanie wpływu tych czynników na profil izoenzymatyczny określonych enzymów w ciele rośliny może być bardzo pomocne w zrozumieniu korelacji między czynnikami zewnętrznymi i wewnętrznymi, które biorą udział w procesach kształtujących ciało rośliny.

#### LITERATURA

1. Anzai T., (1975): Inhibition of synthesis of peroxidases and some proteins by heliangine in *Phaseolus mungo* hypocotyl sections, *J. Exp., Bot.*, 26, 589-595.
2. Anzai T., (1975): Two phases in adventitious root formation in *Phaseolus mungo* hypocotyl cuttings, a phase sensitive to an inhibitor of RNA or protein synthesis and phase sensitive to an inhibitor of DNA synthesis. *J. Exp. Bot.* 26, 580-588.
3. Chao S. E., Scandalios J. G., (1971): Alpha — amylase of maize: differential allelic expression at the amy — 1 gene locus and some physicochemical properties of the isozymes, *Genetics*, 69, 47-61.
4. Chao S. E., Scandalios J. G., (1969): Identification and genetics control of starch — degrading enzymes in maize endosperm. *Biochemical Genetics*, 3, 537-547.
5. Darbyshire B., (1973): The glycoprotein nature of idoleacetic acid oxidase peroxidase fractions and their development in pea roots, *Physiol. Plant.*, 29, 293-297.
6. Darimont E., Baxter R., (1973): Ribosomal and mitochondrial peroxidase isoenzymes of the lentil (*Lens culinaris*) root. *Planta (Berl.)*, 110, 205-212.
7. Davis B., J. (1964): Disc electrophoresis: II Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 404-427.
8. Duke S. H., Koulkari W. L., (1975): Glutamate dyhydrogenase activity in roots: distribution in a seedling and storage root, and the effects of red and far — red illuminations, *Physiol, Plant*, 34, 8—13.
9. Efron Y., Peleg M., (1973): Alcohol dehydrogenase allozymes in the safflower genus *Carthamus* L. *Biochemical Genetics* 9, 299-308.
10. Ekes M., (1970): Electron — microstropic — histochemical demonstration of succinic — dehydrogenase activity in root cells. *Planta (Berl.)*, 94, 37-46.

11. Felder M. R., Scandalios J. G., (1971): Effects of homozygosity and heterozygosity on certain properties of genetically defined electrophoretic variants of alcohol dehydrogenase isozymes in maize. *Molec. Gen. Genetics*, 111, 317-326.
12. Freeling M., Schwartz D., (1973): Genetic relationships between the multiple alcohol dehydrogenases of maize. *Biochemical Genetics*, 8, 27-36.
13. Gardiner M. G., Cleland R., (1974): Peroxidase isozymes of the avena coleoptile. *Phytochemistry*, 13, 1707-1711.
14. Gaspar T., Khan A. A., (1973): Hormonal control of isoperoxidases in lentil embryonic axis. *Plant Physiol.*, 51, 146-149.
15. Gordon A. R., Alldridge N. A., (1971): Cytochemical localization of peroxidase A<sup>1</sup> in developing stem tissue of extreme dwarf tomato. *Can. J. Bot.*, 49, 1487-1496.
16. Gurmurti K., Nanda K. K., (1974): Changes in peroxidase isoenzymes Phaseolus mungo hypocotyl cuttings during rooting. *Phytochemistry*, 13, 1089-1093.
17. Hartman T., Nagel M., Kert H. J., (1973): Organ specific multiple forms of glutamic dehydrogenase in Medicago sativa. *Planta (Berl.)*, 111, 119-128.
18. Heildrich-Sobrinho E., (1975): Codominant isoenzymic alleles as markers of genetics diversity correlated with heterosis in maize. *Theor. Appl. Genet.*, 46, 197-199.
19. Hoess R. H., Smith H. H., (1974): A genetic analysis of peroxidase isozymes in two species of nicotiana. *Biochemical Genetics* 11, 319-323.
20. Kahlem G.: (1975): A specific and general biochemical marker of stamen morphogenesis in higher plants: anodic peroxydases. *Z. Pflanzenphysiol.*, 76.
21. Khan A. A., Gaspar Th. Roe C. H., (1972): Synthesis of isoperoxidases in lentil embryonic axis. *Phytochemistry*, 11, 2963-2969.
22. Krzywański Z., Stroiński A., (1976): Dziedziczenie systemów korzeniowych jęczmienia. IV. Aktywność oksydazy IAA i peroksydazy w różnych częściach roślin sześciu odmian jęczmienia. *Prace Komsji Nauk Rol. i Komisji Nauk Leśnych*, 41, 245-250.
23. Lee T. T., (1974): Cytokinin control in subcellular localization of indoleacetic acid oxidase and peroxidase. *Phytochemistry* 13, 2445-2453.
24. Leonard R. T., Hodgins T. K., (1973): Characterization of plasma membrane-associated adenosine triphosphatase activity of oat roots. *Plant Physiol.*, 52, 6-12.
25. Leonard R. T., Hansen D., Hodges T. K., (1973): Membrane-bound adenosine triphosphatase activities of oat roots. *Plant Physiol*, 51, 749-754.
26. Longo G. P., Scandalios J. G., (1968) Specificity of the dehydrogenases of maize endosperm. *Biochemical Genetics* 2, 177-183.
27. Mäder M., Mayer Y., (1975): Localisation of peroxidase isoenzymes in protoplasts and cell walls of Nicotiana tabacum L. *Planta (Berl.)*, 122, 259-268.
28. Maurer R. H., (1971): Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis. Walter de Gruyter — Berlin — New York.
29. Meudt W., Stecher K. J., (1972): Promotion of peroxidase activity in the cell wall of nicotiana. *Plant Physiol*, 50, 157-160.
30. Michejda J. W., (1970): Integracja struktury i funkcji na poziomie molekularnym, *Kosmos A*, z. 3, 267-289.
31. Mitra R., Jagannath D. R., (1970): Disc electrophoresis of analogous enzymes in hordeum. *Phytochemistry*, 9, 1843-1850.

32. Nielsen G., Scandalios J. G., (1974): Chromosomal location by use of trisomics and new alleles of an endopeptidase in *Zea mays*. *Genetics*, 77, 679-686.
33. Pease D. S., (1964): *Histological techniques for electron microscopy* — 2 nd ed. Academic Press.
34. Penon P., Cecchini J. P., (1970): Peroxidases associated with lentil root ribosomes. *Phytochemistry*, 9, 73-86.
35. Powell B. L., Pickering J. W., (1975) Isoperoxidases from tobacco tissue cultures. *Phytochemistry*, 14, 1715-1717.
36. Przybylska J., (1972): Elektroforetyczna analiza białek jako metoda eksperymentalnej taksonomii roślin. *Postępy Nauk rol.* 3, 23-41.
37. Quail P. H., Scandalios J. G., (1974): Turnover of genecitally defined catalase isozymes in maize *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 1402-1406.
38. Raa J., (1973): Cytochemical localization of peroxidase in plant cells. *Physiol. Plant.*, 28, 132-133.
39. Raa J., (1973): Properties of the ribosome — bound peroxidase (IAA — oxidase of cabbage roots. *Physiol. Plant.* 29, 247-249.
40. Sahulka J., (1971): Electrophoretic investigation of ribonuclease in roots and leaves of *Vicia faba* L. *Plant. (Praha)*, 13, 243-246.
41. Scandalios J. G., (1975): Isozymes ni development and differentiation. *Ann Rev. Plant. Physiol.*, 25, 225-258.
42. Scandalios J. G., (1968): Genetic control of multiple molecular forms of catalase in maize. *Ann N. Y. Acad. Sci.*, 151, 274-293.
43. Scandalios J. G., (1974): Subcellular localization of catalase variants coded by two genetic loci during maize development. *Jour. Hered.*, 32, 65-28.
44. Scandalios J. G., Liu E. H., (1972): The effects of intragenic and intergenic complementation on catalase structure and function in maize: A molecular approach to heterosis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 153, 695-705.
45. Scandalios J. G., (1967): Genetic Control of alcohol dehydrogenase isozymes in maize. *Biochemical Genetics*, 1, 1-8.
46. Scandalios J. G., (1965): Leucine aminopeptidase isozymes in maize development. *Jour. Hered.*, 56, 177-180.
47. Scandalios J. G., Felder M. R., (1971): Developmental expressions of alcohol dehydrogenases in maize. *Develop. Biol.* 25, 641-654.
48. Stafford H. A., Galston A. W., (1970): Ontogeny and hormonal control of polyphenoloxidase isozymes in tobacco pith. *Plant. Physiol.*, 46, 763-767.
49. Stuber C. W., Levings C. S., (1969): Auxin induction and repression of peroxidase isozymes. *Crop Science*, 9, 415-416.
50. Stroiński A., Krzywański Z., (1976): Dziedziczenie systemów korzeniowych jęczmienia. V. Charakterystyka odmianowa składu izoenzymów różnych części rośliny. *Prace Komisji Nauk Roln. i Komisji Nauk Leśnych*, 41, 251-256.
51. Suzuki Y., Ogisto K., (1973): Development of ascorbate oxidase activity and its isoenzyme pattern in the roots of pea seedlings. *Physiol. Planta*, 29, 169-172.
52. Takakuwa S., Suzuki Y., (1971): Ascorbate oxidase formation in the cucumber seedling. *Enzymologia*, 41, 168-174.
53. Torres A., (1974): Genetics of sunflower alcohol dehydrogenase:  $Adh_2$ , non-linkage to  $Adh_1$  and  $Adh_1$  early alleles. *Biochemical Genetics*, 12, 385-392.
54. Torres A., (1974): An intergenic alcohol dehydrogenase isozyme in sunflower. *Biochemical Genetics*, 11, 301-308.

55. Truelove B., Rodriguez-Kabana R., (1975): Changes in the peroxidase activity of subcellular fractions from aging phaseolus hypocotyls. *Can. J. Bot.*, 53, 852-860.
56. Thuan-Hua Ho D., Scandalios J. G., (1975): Regulation of alcohol dehydrogenases in maize scutellum during germination. *Plant. Physiol.*, 56, 56-59.
57. Valanne N., (1975): Peripheral structures of plastids and ultrastructural localization of acid phosphatase and succinic dehydrogenase in a variegated *Betula pubescens* mutant. *Can. J. Bot.*, 53, 1072-1077.
58. Van Der Mast C. A., (1970): The presence of membrane — bound IAA degrading protein-complexes in homogenates of pea roots and the manner of attachment to these membranes. *Acta Bot. Neerl.*, 19, 553-566.
59. Watson J. D., (1974): *Biologia molekularna genu*. PWN Warszawa 1975.
60. Yang N. S., Scandalios J. G., (1974): Purification and biochemical properties of genetically defined malate dehydrogenase in maize. *Arch. Biochem. Biophys.*, 161, 335-353.