

ANDRZEJ ANIOŁ

METODY SEROLOGICZNE W FITOCHEMII

W ciągu ostatnich kilkunastu lat pojawiło się szereg prac, w których autorzy przedstawili wyniki badań nad białkami roślinnymi uzyskane przy pomocy metod serologicznych. Próby zastosowania tych metod pojawiły się jednak wcześniej, już w chwili opracowania metod serologicznych, tj. w latach dwudziestych i trzydziestych. Prace Mez'a i Gohlke'go z tego okresu polegały na zastosowaniu testu serologicznego w badaniach nad białkami różnych gatunków i rodzajów roślin. Na podstawie uzyskanych wyników autorzy ci skonstruowali „drzewo filogenetyczne” świata roślinnego. Niedoskonałość ówczesnych metod serologicznych (Mez i jego szkoła posługiwali się ilościowym testem precypitacyjnym, w którym mierzono stopień zmętnienia mieszaniny antygenów z surowicą) trudności interpretacyjne, wynikające ze słabej wówczas znajomości procesów immunologicznych na poziomie molekularnym oraz zbyt duże znaczenie jakie badacze ci przypisywali cechom serologicznym w systematyce spowodowały, że badania te spotkały się z ostrą krytyką botaników i na jakiś czas je zarzucono.

Opracowanie nowych, jakościowych technik analitycznych — immunodyszfuzji podwójnej, immunoelektroforezy oraz postęp w immunologii pozwalający na lepsze zrozumienie mechanizmu reakcji serologicznej spowodowały ponowne zainteresowanie się tymi metodami w badaniach nad białkami roślinnymi. W pierwszym rzędzie metody serologiczne stosowano w badaniach porównawczych nad białkami z różnych taksonów roślinnych i ten taksonomiczny aspekt wyników badań przy użyciu metod serologicznych jest w dalszym ciągu najważniejszy. Coraz szerzej stosuje się jednak te metody w innych badaniach nad białkami roślinnymi.

Poniżej przedstawiono skrótkowo ważniejsze metody serologiczne, stosowane w fitochemii, zasady interpretacji uzyskiwanych wyników oraz ważniejsze zastosowania tych metod.

Najczęściej stosowane metody fitoserologiczne i zasady interpretacji uzyskiwanych wyników

Reakcja serologiczna jest wysoce specyficzna i zachodzi dzięki powinowactwu strukturalnemu między grupą determinującą — zwaną determinantem danego białka określanego jako antygen i odpowiadającą jej grupą przeciwciała, zwaną

anty-determinantem. Organizm wyższych kręgowców w reakcji na obce białko, wnikać na innej drodze niż przez przewód pokarmowy, wytwarza w surowicy krwi odpowiednie przeciwciała. Poznano wiele różnych przeciwciał, różniących się właściwościami strukturalnymi. Najliczniejszą i najważniejszą grupę stanowią przeciwciała o charakterze gamma-globulin. Oprócz białek szereg innych substancji, np. oligosacharydy, wykazuje właściwości antygenowe. W określonych warunkach reakcji kompleks antygen-przeciwciało precypituje tworząc osad widoczny w odpowiednim medium. W większości stosowanych testów serologicznych precypitat barwi się barwnikami białkowymi co pozwala na dokładniejsze prześledzenie uzyskanego obrazu. Tworzenie się precypitatów i ich charakter są istotą metod serologicznych. Istnieje bogata literatura dotycząca typów, struktury i własności różnych przeciwciał, charakteru reakcji ich z różnymi antygenami, są to specjalistyczne zagadnienia immunologii, których dokładna znajomość nie jest konieczna przy posługiwaniu się prostymi testami serologicznymi. Podstawowe wiadomości z tej dziedziny czytelnik znajdzie w podręcznikach immunologii.

Poniżej przedstawiono krótkie opisy najczęściej stosowanych metod serologicznych.

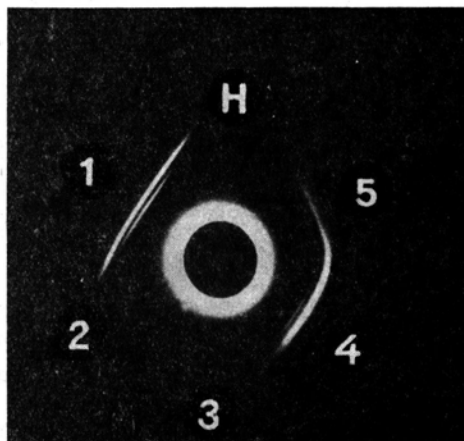
1. Immunodyfuzja

Najczęściej stosuje się metodę podwójnej immunodyfuzji na żelu agarowym według Ouchterlony (1964). Polega ona na umieszczeniu antygenów i surowicy odpornościowej w studzienkach wyciętych w warstwie żelu, rozlanego na płytce szklanej. Antygeny i przeciwciała dyfundują jednocześnie do żelu i w punkcie wyrównanych stężeń (tzw. punkt ekwiwalentu) tworzą widoczne precypitaty. Każdy tworzący się precypitat stanowi immunospecyficzną barierę dla danej pary antygen-przeciwciało, hamując ich dalszą dyfuzję. Utworzony precypitat nie hamuje natomiast dyfuzji innych par antygen-przeciwciała. W efekcie typowy obraz immunodyfuzyjny surowicy zawierającej szereg przeciwciał z mieszaniną antygenów składa się z kilku linii precypitacyjnych (ryc. 1). Przy porównywaniu kilku mieszanin antygenów z daną surowicą odpornościową, powstające linie precypitacyjne mogą się łączyć ze sobą, krzyżować lub tylko częściowo łączyć. Metoda nadaje się do badania składu antygenowego ekstraktów białkowych z roślin i pozwala na określenie zależności między różnymi antygenami. W badaniach nad występowaniem określonego białka w różnych ekstraktach używa się surowic specyficznych zawierających przeciwciała tylko w stosunku do określonego białka lub kilku białek. Aby uzyskać takie surowice często stosuje się metodę specyficznej absorpcji przeciwciał na płytce immunodyfuzyjnej wg Björklunda (Crowle 1961). Metoda polega na wykorzystaniu tworzenia się immunospecyficznych barier przez precypitujące pary antygenów i przeciwciał. Żel, w którym będzie przeprowadzana podwójna immunodyfuzja ze specyficzną absorpcją przeciwciał nasycy się wstępnie określonym antygenem lub mieszaniną antygenów. Po wnikięciu antygenów do żelu, do studzienek, nanosi się badaną surowicę i ekstrakty analogicznie jak w normalnej immunodyfuzji. Przeciwciała

specyficzne dla antygenów z ekstraktu użytego do absorpcji precypitują, tworząc charakterystyczny pierścień wokół studzienki (ryc. 2). Pozostałe przeciwciała dyfundują przez taki pierścień i tworzą precypitaty z innymi antygenami, np. jeżeli surowica odpornościowa zawiera trzy rodzaje przeciwciał *ABC*, a chcemy zbadać występowanie białka specyficznego dla przeciwciała *A* w szeregu ekstraktach, wówczas absorbujemy z surowicy przeciwciała *B* i *C* odpowiednimi antygenami.



Ryc. 1



Ryc. 2

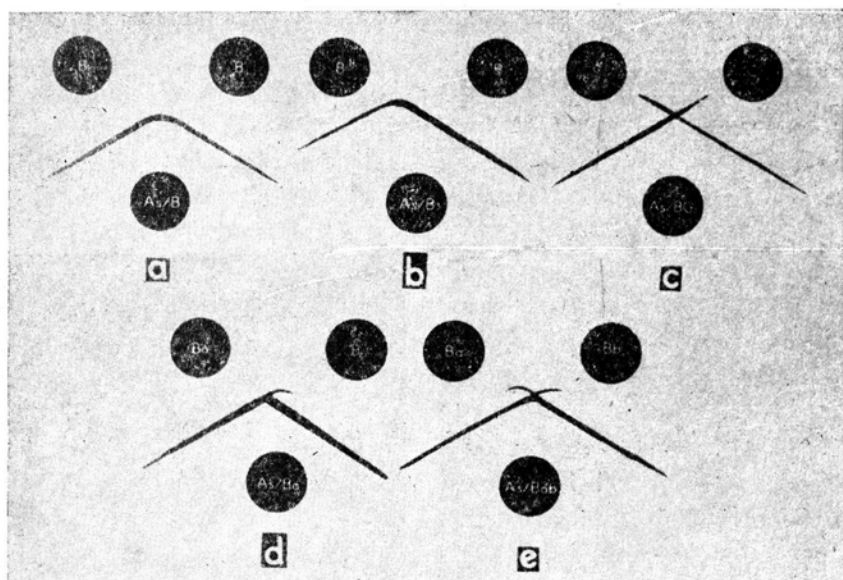
Ryc. 1. Przykład immunodyfuzji: surowica odpornościowa na białka nasion kozińcy *Aegilops speltoides* (środkowa studzienka) reaguje z wieloma antygenami z ekstraktów z nasion innych gatunków kozińcy: 1. *A. squarrosa*, 2. *A. speltoides* (reakcja odniesienia = homologiczna), 3. *A. crassa*, 4. *A. caudata*, 5. *A. cylindrica* i 6. *A. ovata*

Ryc. 2. Przykład immunodyfuzji z absorpcją przeciwciał w żelu: do centralnej studzienki, przed naniesieniem surowicy, wprowadzono antygeny z nasion pszenicy *Triticum aegilopoides*. Po dodaniu surowicy odpornościowej na białka kozińcy *Aegilops speltoides*, przeciwciała reagujące z odpowiednimi antygenami tej diploidalnej pszenicy tworzą w formie pierścienia precipitat wokół studzienki. Przez tę barierę precipitatu dyfundują inne przeciwciała tej surowicy, tworząc precipitaty z odpowiednimi antygenami z: 1. *Elymus giganteus*, 2. *Secale cereale*, 4. *Triticum timopheevi* i 5. *Aegilops speltoides*. W ekstrakcie z nasion *Hordeum vulgare* (3) nie było antygenów reagujących z powyższą surowicą po jej wysyceniu białkami z *Triticum aegilopoides*. W studzience *H* — kontrolnej, naniesiono ekstrakt z nasion *Triticum aegilopoides*

Jako medium stosuje się najczęściej 1% roztwór agarowy w fizjologicznym roztworze soli (0,86% NaCl) lub buforach o pH od 6,0 do 8,6 (najczęściej bufory weronalowe). Grubość warstwy żelu nie powinna być większa niż 1 mm, przy tej grubości uzyskuje się wiarygodne wyniki w najkrótszym czasie — 72 godz.

Stosuje się najróżniejsze układy studzienek, zależnie od typu badań; najtypowszy jest układ ze studzienką centralną wypełnioną odpowiednią surowicą i w równym

promieniu (5—10 mm) rozmieszczonymi studzienkami na antygeny. Po utworzeniu się precypitatów żel należy kilkakrotnie wypłukać roztworem 0,85% NaCl w celu wymycia resztek surowicy i białek. Po wypłukaniu płytki z żelem suszy się i barwi, najczęściej roztworem azokarminu lub czerni amidowej.



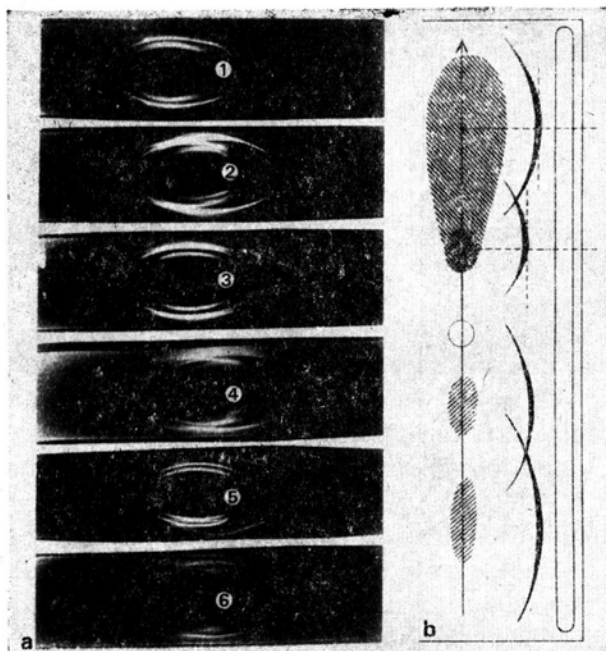
Ryc. 3. Zasadnicze typy reakcji między precypitatami w immunodyfuzji wg Crowle, 1961 (10), *a* i *b* obraz reakcji identyczności (zgodności) badane białka są identyczne serologicznie, *c* — reakcja nieidentyczności (niezgodności), badane białka różnią się serologicznie, *d* i *e* — reakcja częściowej identyczności

Na obrazach immunodyfuzyjnych oblicza się ilość łuków precypitacyjnych tworzących w reakcji danego ekstraktu białkowego z surowicą odpornościową w porównaniu z ilością łuków tworzących się w reakcji homologicznej (surowica odpornościowa + mieszanina antygenów używanych do immunizacji). Zasadnicze typy reakcji powstających między precypitatami ilustruje ryc. 3.

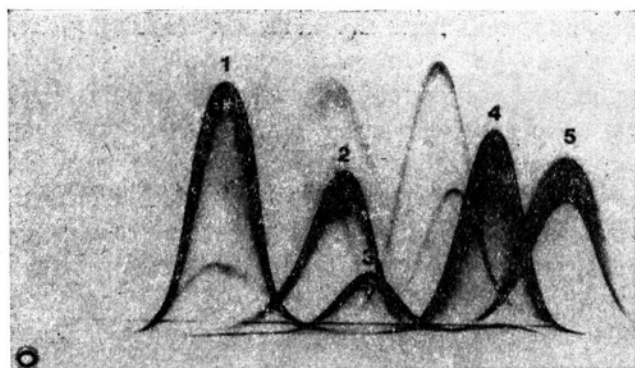
2. Immunoelktroforeza

Najczęściej stosuje się mikrometodę wg Scheideggera (Grabar 1964). Immunoelktroforeza jest połączeniem elektroforezy z immunodyfuzją. Mieszanina białek jest najpierw rozdzielana elektroforetycznie a następnie surowica odpornościowa dyfundując do medium z rozdzieloną mieszaniną białek tworzy łuki precypitacyjne w punktach ekwiwalentu odpowiednich antygenów i przeciwciał (ryc. 4). Metoda umożliwia jednoczesne zbadanie własności elektroforetycznych i immunologicznych badanych białek. W przypadku dużej ilości par antygen-przeciwciało pozwala na wyraźniejsze ich zbadanie niż w immunodyfuzji.

Modyfikacją tej metody jest tzw. podwójna elektroforeza (Clarke 1968). Mieszanina białek rozdzielona elektroforetycznie w jednym kierunku, jest następnie



Ryc. 4. a — Przykład immunoelektroforezy: surowica odpornościowa na białka nasion perzu (*Agropyron intermedium*) w reakcji z rozwiniętymi w elektroforezie białkami nasion: 1. *Agropyron desertorum*, 2. *A. smithii*, 3. *A. sibiricum*, 4. *A. trachycaulum*, 5. *A. caninum* i 6. *A. cristatum*. b — schemat powstawania łuków precipitacyjnych w elektroforezie



Ryc. 5. Przykład immunoelektroforezy dwukierunkowej białek surowicy krwi. Wysokość tworzących się pików jest wskaźnikiem ilościowej zawartości poszczególnych antygenów w mieszaninie

rozdzielana w drugim wnikając jednocześnie do warstwy żelu zawierającego odpowiednią surowicę odpornościową. Poszczególne antygeny precipitują z odpowiednimi przeciwciałami, tworząc różnej wysokości łuki, zależnie od ilości danego antygeny (ryc. 5). Metoda pozwala na dokładne analizowanie składu antygenowego badanych ekstraktów oraz na określenie półilościowej zawartości poszczególnych antygenów. Jako medium najczęściej używa się również agarozy, ostatnio szereg

autorów z powodzeniem użyło jako nośnika cienkiej folii z octanu celulozy (Kohn, 1961, Leurment 1963). Procedura płukania i barwienia jest taka sama jak w immunodyszuzji. W mikrometodzie używa się szkiełek mikroskopowych pokrytych warstwą żelu.

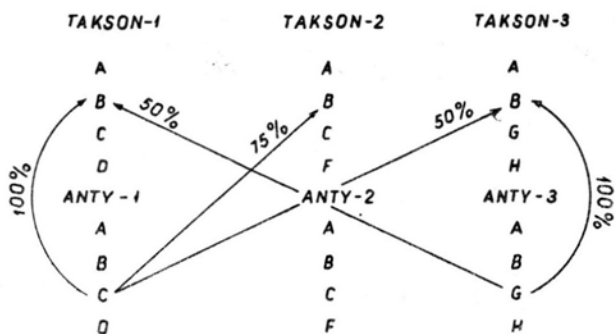
Metody immunodyszuzji i immunoelektroforezy były opracowane i są powszechnie stosowane w diagnostyce klinicznej i w literaturze z tej dziedziny czytelnik znajdzie dalsze szczegóły metodyczne.

3. Testy ilościowe

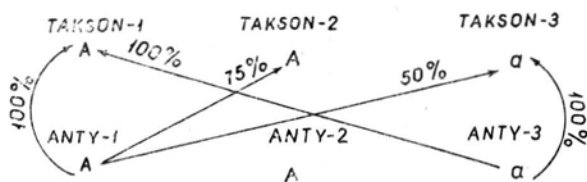
Metody ilościowe polegają na pomiarze ilości precypitatu, utworzonego w standardowych warunkach reakcji. Jedną z takich metod, stosowaną w badaniach nad białkami roślinnymi opisał Smith i Frey (1970). Metoda polega na mieszaniu stałych ilości surowicy odpornościowej i serii rozcieńczeń mieszaniny antygenów. Po okresie inkubacji (12—24 godz.) w temp. 35°C i utworzeniu się precypitatów mierzy się ich ilość. Przyjmując sumę zawartości precypitatów w serii rozcieńczeń antygeny homologicznego dla danej surowicy za 100, zawartość precypitatów w pozostałych seriach heterologicznych wyraża się w procentach reakcji homologicznej. Terminy homologiczny i heterologiczny jakkolwiek często stosowane w serologii są wieloznaczne, używane w wielu dziedzinach nauki i dlatego łatwo o mylną interpretację. Z tego powodu Fairbrothers (1966) zaproponował terminy reakcja odniesienia (reference reaction) dla reakcji homologicznej i reakcja krzyżowa (cross reaction) dla reakcji heterologicznej. W publikacjach spotyka się oba rodzaje terminologii.

Używanie ilościowych metod serologicznych w celu określenia pokrewieństwa między badanymi genotypami opiera się na założeniu, że kompleks białkowy danego osobnika determinowany jest przez zapis genetyczny w DNA, a zatem bardziej podobne genotypy mają więcej podobnych białek niż genotypy mniej spokrewnione. Odzwierciedleniem takiej sytuacji w teście serologicznym ma miejsce wówczas, gdy ilość tworzonego precypitatu zależy od stopnia podobieństwa między antygenami i przeciwciałami, gdy wartości uzyskiwane w testach bliźniaczych są zgodne tzn. wynik reakcji surowicy anty *A* i antygeny *B* jest zgodny z rezultatem reakcji surowicy anty *B* z antygenem *A*, oraz gdy rezultat reakcji krzyżowej (heterologicznej) nie jest większy od wyniku reakcji odniesienia (homologicznej). Tego typu zależność serologiczną ilustruje ryc. 6. Litery pod odmianami symbolizują różne białka, odmiany 1 i 2 mają trzy wspólne białka, odmiany 1 i 3 tylko dwa. Tym samym odmiany te są uszeregowane według pokrewieństwa. Białka z tych odmian wstrzyknięte zwierzęciu wytwarzają przeciwciała w stosunku do poszczególnych białek. Jeżeli surowicą odpornościową na białka odmiany 1 precypitowane będą ekstrakty z badanych trzech odmian, wówczas najsilniejszej reakcji można się spodziewać w przypadku odmiany 1, mniejszej przy odmianie 2 i najmniejszej w przypadku odmiany 3. Podobnie, w wypadku testowania surowicą anty- odmiana 3, najsilniejszej reakcji można oczekiwać z odmianą 3 a najsłabszej z 1. Przyjmując wynik reakcji odniesienia za 100, w obu wypadkach serologiczne powinowactwo odmian 1 i 3 równa się 50.

W badaniach serologicznych materiału roślinnego, w niektórych przypadkach, uzyskiwane wyniki nie pokrywają się z powyższym modelem, reakcje bliźniacze nie pokrywają się ale się uzupełniają (lustrzane odbicie) oraz niekiedy występuje zjawisko tzw. nadreakcji, czyli reakcja krzyżowa jest intensywniejsza od reakcji odniesienia. Uproszczony model takiej sytuacji przedstawia ryc. 7 (Smith, Frey; 1970), Przed-



Ryc. 6



Ryc. 7

Ryc. 6 i 7. Schematy mechanizmu ilościowej reakcji serologicznej *in vitro*, objaśnienia w tekście

stawione na modelu trzy odmiany zawierają wspólne białko A jednak nie w identycznych ilościach, najwięcej tego białka jest w odmianie 1, najmniej w 3. Antygeny A z tych trzech odmian po wstrzyknięciu zwierzętom powodują powstawanie przeciwciał w stosunku do A we wszystkich trzech przypadkach, tym samym uzyskane surowice są równoważne ale reaktywność antygenów z poszczególnych odmian z takimi surowcami nie jest jednakowa. Gdy surowica odpornościowa anty 1 będzie reagowała z antygenem z tych trzech odmian, wynik reakcji będzie najwyższy w przypadku odmiany 1 a najniższy u odmiany 3, jednak w reakcji bliźniaczej — surowica anty-3 precypitująca antygeny z tych trzech odmian — nie będzie taki sam, również i tym razem najwyższa reakcja wystąpi w przypadku odmiany 1 a najniższa w wypadku reakcji odniesienia z antygenami z odmiany 3. Mamy tutaj do czynienia ze zjawiskiem nadreakcji — reakcja krzyżowa (anty 3 + antygen 1) jest intensywniejsza od reakcji odniesienia (anty-3 + antygen 3).

Modele przedstawione na rysunkach 6 i 7 ilustrują typy różnic serologicznych między organizmami; model pierwszy obrazuje występowanie dużych różnic jakościowych między białkami silnie zróżnicowanych genotypów (różne rodzaje i gatunki),

model drugi obrazuje różnice ilościowe między podobnymi białkami pochodzącymi z blisko spokrewnionych osobników, te różnice ilościowe maskują w teście występowanie różnic jakościowych.

Zastosowanie metod fitoserologicznych

1. Systematyka

Ze względu na udział w mechanizmie przekazywania i odczytywania informacji genetycznej w żywych organizmach białka oraz kwasy nukleinowe (DNA i frakcje RNA) zaliczane są do tzw. biologicznych semantydów. Badania nad porównywaniem struktury homologicznych białek z różnych organizmów mają bezpośredni aspekt taksonomiczny. Specyficzność reakcji serologicznej usprawiedliwia stosowanie metod immunologicznych w systematyce (Boulter 1968). Toteż początkowo metody te zastosowano w badaniach taksonomicznych i do tej pory najszerzej są stosowane w tej dziedzinie. We wczesnych pracach nad serologią porównawczą białek roślinnych tzw. szkoły królewieckiej (Mez i inni) cechom serologicznym przypisywano bardzo duże znaczenie taksonomiczne. We współczesnych badaniach tego typu, cechy serologiczne rozpatrywane są jako równorzędne taksonomicznie z innymi danymi (morfologicznymi, cytogenetycznymi). Metody serologiczne stosuje się najczęściej jako źródło dodatkowych informacji w przypadku taksonów trudnych do sklasyfikowania.

Kloz, Turkowa i Kłozowa (1960) badając pokrewieństwo serologiczne białek z różnych organów roślin plemienia *Viciaceae* wykazali, że dzięki specyficzności antygenów roślinnych metody serologiczne dostarczają istotnych danych taksonomicznych. Autorzy ci wykazali również, że metody serologiczne są użyteczne przy porównywaniu zarówno indywidualnych białek jak i całych kompleksów białkowych. Dane uzyskane tymi metodami są porównywalne i opierają się na stopniu pokrewieństwa strukturalnego antygenów. Stopień pokrewieństwa antygenów zależy od ilości wspólnych determinantów serologicznych w badanych białkach. Obiektem porównawczych badań serologicznych mogą być białka strukturalne jak również i białka zapasowe, pod warunkiem, że porównuje się ten sam rodzaj białek pochodzących z analogicznych organów roślin znajdujących się w porównywalnych stadiach rozwojowych. Davis i Heywood (1963) omawiając przydatność metod serologicznych do badań taksonomicznych, potwierdzili wcześniejsze poglądy (Gell, Hawkes, Wright 1960) według których bardziej wartościowych danych taksonomicznych dostarczają metody jakościowe (immunodyfuzja, immunoelektroforeza) niż ilościowe. Na poparcie tego poglądu autorzy ci omówili krytycznie wczesne prace Meza w których posługiwano się prostym testem ilościowym. Jednak współczesne dane ilościowe uzyskane przez Boydena (1958), Kloz (1961) i Moritz (1964) wykazały przydatność taksonomiczną metod ilościowych. Obecnie większość badaczy uważa, że serologiczne metody ilościowe i jakościowe dostarczają różnego rodzaju informacji taksonomicznych, wzajemnie się uzupełniających (Fairbrothers 1966, Hawkes 1968).

Przy użyciu metod serologicznych badano pokrewieństwa między białkami szeregu taksonów roślin. Dla zorientowania czytelnika przytoczymy najważniejsze prace z tej dziedziny.

Fairbrothers (1966) przeprowadził serologiczne badania porównawcze nad białkami nasion taksonów z rodzajów *Cornus*, *Davidia*, *Carrya* i *Nyssa*. Dane serologiczne wskazujące na pokrewieństwa między gatunkami *Cornus* i między gatunkami z rodzaju *Nyssa* pokrywają się z innymi danymi taksonomicznymi dotyczącymi tych gatunków.

Podobne rezultaty badań serologicznych uzyskali Jensen (1966) w badaniach nad *Ranunculaceae*, Kloz (1971) u *Leguminosae*, Hawkes i Tucker (1968) u *Solanaceae*. Serologiczne badania Voughan (1968) u *Brassica* ujawniły pewne powiązania w tej grupie roślin w zależności od stopnia ploidalności poszczególnych taksonów. Smith (1972) badając pokrewieństwa filogenetyczne w rodzaju *Bromus*, użył testów serologicznych w rekonstrukcji ewolucji tego taksonu. Badania serologiczne nad formami z rodzaju *Hordeum* (Anioł 1973) wykazały znaczne powinowactwo między białkami form często bardzo różnych morfologicznie.

Przy użyciu metod serologicznych badano dziedziczenie się indywidualnych białek w *Triticale* (Hall 1959), i mieszańcu międzyrodzajowym *Lolium-Festuca* (Prus-Głowacki, 1971). Metody te okazały się przydatne w badaniach nad występowaniem specyficznych dla genomu *B* białek w różnych gatunkach pszenicy (Anioł 1974 a i b).

W ostatnich latach metody serologiczne stosowane są również w innych dziedzinach badań nad białkami roślinnymi:

1. W badaniach nad zmianami struktury i funkcji białek w procesach ontogenezy u *Arachis hypogea* (Daussant i inni 1969 a i b), *Vicia* (Ghetie, 1965) i *Lupinus* (Głowacki) oraz w trakcie przechowywania nasion soi (Jaffe i inni 1966).

2. w badaniach nad mechanizmem dziedziczenia się i metodą identyfikacji różnych systemów samoniezgodności u roślin z rodzaju *Brassica* (Wallace, 1968, Nasrallah, 1967).

3. w badaniach nad mechanizmem heterozji. Posługując się ilościowym testem precipitacji *in vitro* próbowano określić optymalnych partnerów do krzyżówek w programie heterozyjnej hodowli owsa (Smith, Frey, 1970) i kukurydzy (Dimitrov, 1974). W pracach tych autorzy zakładają, że prawdopodobieństwo wystąpienia efektu heterozji w pierwszym pokoleniu krzyżówkowym jest tym większe im bardziej oddalone serologicznie są formy rodzicielskie.

4. testy serologiczne zastosowano do badania domieszek innych gatunków mąki w mąkach makaronowych. Z surowicy odpornościowej na białka mąki z heksaploidalnej pszenicy *Triticum aestivum* wytrącono wszystkie przeciwciała wspólne z pszenicą twardą, której mąka służy do wyrobu makaronu. Taką specyficzną surowicą na białka pszenicy zwyczajnej testowano mąkę makaronową z różnymi domieszkami mąki zwykłej. Przy pomocy tej metody można wykryć domieszki powyżej 10%, które są niewykrywalne innymi metodami (Piazzzi, Cantagalli, 1969).

5. w badaniach nad strukturą i specyficznością białek roślinnych Kling (1968) badał immunologiczną specyficzność gliadyn zbożowych oraz wpływ chemicznych

przekształceń cząsteczki białka na jego własności immunologiczne. Podobne badania prowadzono w odniesieniu do inhibitora trypsyny z nasion soi (Catsimpooulas i inni, 1969).

Rozwój technik serologicznych pozwala na coraz szersze ich stosowanie w badaniach nad białkami roślinnymi. Z drugiej strony coraz dokładniejsze badania nad strukturą i funkcją poszczególnych białek roślinnych wymagają coraz precyzyjniejszych metod, a metody serologiczne należy do takich zaliczyć. W załączeniu podano szerszą niż cytowana literaturę aby zorientować czytelnika w możliwościach stosowania metod immunologicznych w badaniach nad białkami roślinnymi.

Zakład Biochemii i Fizjologii Żywienia Roślin IUNG Pulawy

LITERATURA

- Anioł A., Nowacki E., 1973. *Serological relationships within Hordeum genus*. Genetica Polonica, 14, 3, 255 - 267.
- Anioł A., 1974a., *Is Triticum macha ssp. tubalicum var. subletschumicum an ancient triticales? A serological approach*. Z. Pflanzenzüchtg. 72, 226—232.
- Anioł A., 1974b., *A serological investigation of wheat evolution*. Z. Pflanzenzüchtg. 73, 194—203.
- Boulter D., Thurman D. A., 1968. *Acrylamide gel electrophoresis of proteins in plant systematics.*, w. J. G. Hawkes „*Chemotaxonomy and Serotaxonomy*”, Academic Press, London and New York, 39—48.
- Boyden A., 1958. *Comparative serology: aims, methods and results.*, w W. H. Cole (ed) „*Serological and biochemical comparison of proteins*”. XIV Annual Protein Conference. Rutgers University Press. New Brunswick, N. J.
- Catsimpooulas N., Rogers D. A., Meyer E. W., 1969. *Immunochemical and disc elektrophoresis study of soybean trypsin inhibitor SBTIA-2*. Cereal Chemistry, 46, 136—144.
- Clarke M. H. G., Freeman T., 1968. Clin. Sci., 25, 403 (cyt. za Immuno-electrophoresis: Application Manual AM 311).
- Clausen J., 1970. *Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules.*, w T. S. Work and E. Work (ed.) „*Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*”. North-Holland Publishing Company, v. 1., 397—572.
- Greel G. C., Ericson J. E., Schulz-Chaeffer J., 1965. *Biosystematic investigations in the genus Agropyron Gaertn.* III. Serological, morphological and cytological comparison of species within the crested wheatgrass complex (Section Agropyron). Crop Sci., 5, 316—320.
- Crowle A. J., 1961. „*Immunodiffusion*”, Academic Press, New York and London.
- Daussant J., Neucere N. J., Yatsu L. Y. 1969. *Immunochemical studies on Arachis hypogaea proteins with particular reference to the reserve proteins*. I. Characterisation, distribution and properties of alpha-arachin and alphaconarachin. Plant Physiol. 44, 4, 471—479.
- Daussant J., Neucere N. J., Konkretion E. J., 1969b. *Immunochemical studies on Arachis hypogaea proteins with particular reference to the reserve proteins*. II. Protein modification during germination. Plant Physiol. 44, 4, 480—484.
- Davis P. H., Heywood V. H., 1963. „*Principles of angiosperm taxonomy*”, D. Van Nostrand Co., Inc. Princeton, N. Y., 254—258.
- Dimitrov P., i inni. 1974. *Immunochemical prognosis of heterosis in Zea mays*. Theoretical and Applied Genetics, 45, 91—95.
- Fairbrothers D. E., 1966a. *A comparison and interpretation of serological data in plant systematics.* w Z. Landa (ed.) „*Mechanism of mutation and inducing factors*”, Academia, Praga.

- Fairbrothers D. E., 1966b. *Comparative serological studies in plant systematics*. Serological Mus., 35, 2—7.
- Fairbrothers D. E., Johnson M. A., 1964. *Comparative serological studies within the families Cornaceae (Dagwood) and Nysaceae (Sour Gum.)*. w C. A. Leone (ed.) „Taxonomic biochemistry and serology”, Roland Press. N. Y., 305—318.
- Gell P. G. Hawkes J. G., Wrigt S. T., 1960. *The application of immunological methods to the taxonomy of species within the genus Solanum*. Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. B., 151, 364—383.
- Ghetie V., 1966. *Evolution of protein characters in ontogenesis of higher plants.*, w Z. Landa (ed.) „Mechanism of mutation and inducing factors”, Academia, Praga, 489—503.
- Prus-Głowacki W., 1975. *Changes of protein Fraction in the Ontogenesis of Four Lupin Species Studied by immunological methods*. II. Changes of protein fractions during germination and development of etiolated plants and grown in light. Genetica Polonica 16 (1), 47—52.
- Grabar P., Escribano M. J., Benhamou N., Daussant J., 1965, *Immunochemical study of wheat, barley and malt proteins*. J. agric. Food Chem. 13,5, 392—398.
- Grabar P., Burtin P., 1964. „Immuno-electrophoretic analysis”, Elsevier Publ. Co., Amsterdam, London, New York.
- Hall O., 1959. *Immuno-electrophoretic analyses of allopolyploid ryewheat and its parental species.*, Hereditas 45, 495—504.
- Hawkes J. G., Tucker W. G., 1968. *Serological assesment of relationships in flowering plant family (Solanaceae).*, w J. G. Hawkes (ed.) „Chemotaxonomy and Serotaxonomy”, Academic Press, London, New York, 77—88.
- Jaffe W. G., Palozzo A., 1966. *Stability of antigens and lectins from kindey beans*. Serological Mus. 36, 7.
- Jennings R. K., Kaplan M. A., 1961. *Quantitative comparative serology*. Serological Mus. 25, 5—8.
- Jensen U., 1967. *Serologische Untersuchungen zur Frage der Verwandtschaft zwischen Ranunculaceen und Papaveraceen Berlich*. Deutsch. Bot. Gesellschaft, 80, 9, 621—624.
- Kling H., 1968. *Immunologische Spezifität der Getreide-prolamin- Komponenten*. Naturwissenschaften, 10, 493—494.
- Kloz J., Turkova V., Klozova P. 1960. *Serological investigation of taxonomic specifity of proteins in various plant organs in some taxa of the family Viciaceae*. Biologia Plantarum, 2, 126—137.
- Kloz J., 1961. *The use of quantitative ring precipitation for the determination of cross reactions with special reference to comparative serology*. Biologia Plantarum, 3, 217—227.
- Kloz J. 1962. *An investigation of the protein characters of the four Phaseolus species with special references to the question of their phylogenesis*. Biologia Plantarum, 4, 85—90.
- Kloz J. 1971. *Serology of the Leguminosae*. w J. B. Harborne, D. Boulter i B. L. Turner (ed.) „Chemotaxonomy of the Leguminosae”, Academic Press, London, New York, 309—365.
- Klozova E., 1966. *Interrelations among several asiatic species of the genus Phaseolus studied by immunochemical methods.*, w Z. Landa (ed.) „Mechanism of mutation and inducing factors”, Academia, Praga, 485—487.
- Kohn J. 1961. *Immunodifusion technique on celluloseacetate. Proteins of the biological fluids*. Elsevier Publ. Comp. Amsterdam.
- Kubo K. 1964. *An empirical equation for the precipitin reaction system and its application to systematic serology*. Serological Mus. 31, 1—2.
- Laurent B. 1963. *Immunolectrophoresis on cellulose-acetate*. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 15, 98.
- Moritz O., Jensen U., 1961. *An attempt at a formular description of procedures and results in comparative serology*. Serological Mus. 25, 1—5.
- Moritz O. 1964, *Some special features of serobotanical work*. w C. A. Leone (ed.) „Taxonomic biochemistry and serology”. Ronald Press Co., New York.
- Moritz O. 1966. *Revealing systematical distribution of protein characters by serological methods.*, w Z. Landa (ed.) „Mechanism of mutation and inducing factors”, Academia, Praga, 443—456.
- Nasrallah M. E., Wallace D. H. 1967. *Immunogenetics of selfincompatibility in Brassica oleracea, L.* Heredity, 22, 519—527.
- Ouchterlony O., 1964. *Gell-diffusion techniques.*, w J. F. Acroyd (ed.) „Immunological methods”. Blackwell Sci. Publ. Oxford, England, 55—78.

- Piazzini S. E., Cantagalli P. 1969. *Immunochemical analysis on soluble proteins of wheat*. Cereal Chemist 46, 642—646.
- Pickering J. L., Fairbrothers D. E., 1966. *A serological investigation of Magnolia hybrids and parental species*. Serological Mus. 36—4—6.
- Prus-Głowacki 1970. *Możliwość zastosowania metod immunologicznych w hodowli roślin*. Biul. Branż. ZHRiN, 5/26/, 9—18.
- Prus-Głowacki W., Sulowski S., Nowacki E. 1971. *Immuno-electrophoretic studies of Lolio-Festuca allopolyploid and its parental species*. Biochem. Physiol. Pflanzen, 162, 417—426.
- Smith R. L., Frey K. J., 1970. *Use of quantitative serology in predicting the genotypic relationships of oat cultivars*. Euphytica, 19, 447—458.
- Smith P. M., 1972. *Serology and species relationships in annual bromes (Bromus L. sect. Bromus)*. Ann. Bot. 36/144/, 1—30.
- Vaughan J. G., Gordon E. I., 1973. *A taxonomic study of Brassica juncea using the techniques of electrophoresis, gas-liquid chromatography and serology*. Ann. Bot. 37, 167—184.
- Vaughan J. G. 1968. *Seed protein studies of Brassica and Sinapis species.*, w J. G. Hawkes (ed.) „Chemo-taxonomy and Serotaxonomy” Academic Press, London, New York, 103—110.
- Wallace D. H., Nasrallah M. E. 1968. *Polination and serological procedures for isolating incompatibility genotypes in the Crucifers*. Cornell Exp. Sta. Memoir 406.
- Williams C. A. 1960. *Immuno-electrophoresis.*, Sci. Am. 202, 130—140.