

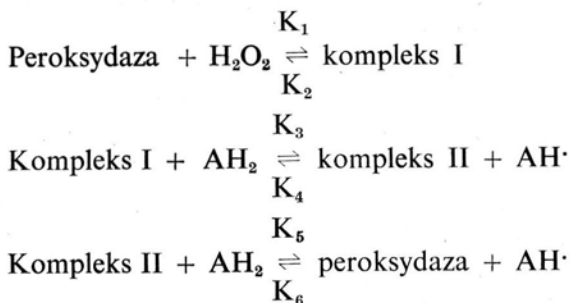
JERZY ŁOBARZEWSKI

PEROKSYDAZY ROŚLINNE

1. Budowa i właściwości peroksydaz roślinnych

Peroksydazy roślinne i zwierzęce są hemoproteinami (90). Komisja do Spraw Enzymów zakwalifikowała ten typ biokatalizatora jako EC.1.11.1.7. oksydoreduktaza donor: nadtlenek wodoru.

Mechanizm katalizowanej reakcji utleniania z udziałem peroksydazy proponowany przez Chance [15], a potem modyfikowany przez George [30] przebiega jak następuje:



Kompleks I jest zdolny do przenoszenia dwóch równoważników utleniających podczas gdy kompleks II przenosi tylko jeden. AH_2 stanowi utleniający się substrat a $\text{AH}\cdot$ wolny rodnik tworzący się w tej reakcji. Schemat tej reakcji przypomina mechanizm proponowany przez Fromma [24] typu ping-pong dla trzech substratów. Fenole stanowią dwa niezależne substraty a H_2O_2 jest trzecim substratem. Rodniki fenoksy powstające w tej reakcji mogą tworzyć się w dwu oddzielnych stadiach [120]. Łączenie rodników prowadzi do utworzenia dimeru. Jeżeli by rodniki były uwalniane do roztworu można by się spodziewać tworzenia mieszanin połączonych produktów w rezultacie czego powstawałyby o,o'-dwufenol, p,p-dwufenol i o,p-dwufenol. Doświadczalnie jednak stwierdzono tylko pojedynczy produkt reakcji enzymatycznej (o,o-dwufenol) co sugeruje, że rodniki pozostają

połączone z cząsteczką białka [18]. Wynika stąd, że połączenia te powstają na powierzchni białka a fenole powiększają efekt modyfikacji enzymu [18, 23].

Donorami wodoru reakcji katalizowanej przez peroksydazę mogą być fenole i aminy aromatyczne o bardzo zróżnicowanym powinowactwie do enzymu (tab. I)

Tabela I

Właściwości Km peroksydazy z korzenia chrzanzu [11] i peroksydazy grzybowej z *Trametes versicolor* [65] wobec donorów wodoru

Substraty + peroksydaza z chrzanzu	Wartości Km m mol l ⁻¹
Kwas p-hydroksyfenylooctowy	5,00
Kwas o-hydroksyfenylooctowy	3,00
p-tyrozyna	3,00
Fenol	0,90
2,7-dwuhydroksynaftalen	0,13
1-naftalen	0,10
Septonina	0,10
o-krezol	0,055
Gwajakol	0,05
p-p'-dwufenol	0,05
p-krezol	0,04
Kwas homowanilinowy	0,02
o-o'-dwufenol	0,02
2-naftol	0,01
m-krezol	0,01
m-tyrozyna	0,006
Substraty + peroksydaza grzybowa	
Kwas ferulowy	0,25
Gwajakol	1,17
Benzydyna	4,40
p-fenylendwuamina	10,0
o-dwuaminydina	0,006
Kwas wanilinowy	2,0

[11, 65]. Najczęściej używanymi donorami wodoru są: benzydyna, gwajakol i ortodwuaminydina. Utlenianie tych związków katalizowane przez peroksydazę w obecności H₂O₂ prowadzi do tworzenia barwnych produktów reakcji.

Peroksydazy zawierają grupę prostetyczną zbudowaną z protohematyny IX. Powoduje to charakterystyczną absorpcję światła. Maksimum absorpcji peroksydazy znajduje się między 400—405 nm w tak zw. paśmie Soreta. Maksimum absorpcji w pasmie Soreta ulega przesunięciu do 420 nm, gdy do środowiska zawierającego peroksydazę wprowadzić H₂O₂. Nadmiar H₂O₂ hamuje szybkość tworzenia się kompleksu enzym-substrat.

Centrum aktywnym peroksydazy przyłączającym H₂O₂ jest żelazo układu hematynowego a donator wodoru wiąże się z tą częścią białka peroksydazy, w której pobliżu znajduje się układ hematynowy. Wyniki badań przy zastosowaniu rezo-

nansu elektronowego „EPR” wykazały, że donory wodoru takie jak hydrochinon, rezorcyna lub gwajakol łączą się z resztą histydyny położoną w odległości 1 nm od atomu żelaza w cząsteczce peroksydazy [46, 56, 93, 119]. Zaobserwowano równocześnie zmiany planarności żelazo-porfiryn.

Przesunięcie maksimum absorpcji peroksydazy z 400 do 420 nm uzyskuje się w wyniku działania CO, CN⁻ lub Na₂S₂O₄. Cyjanki, tlenki węgla i azydki są jednocześnie niespecyficznymi inhibitorami tego enzymu, tworząc kompleksy z żelazem hemowym peroksydazy. 2,3-dwumerkaptopropanol (BAL) powoduje inhibicję kompetycyjną peroksydazy chrzanu współzawodnicząc z H₂O₂ o centrum aktywne tego enzymu [32]. Ten sam typ hamowania aktywności peroksydazy grzybowej zaobserwowano pod wpływem glutationu [51].

Zawartość trójwartościowego żelaza w cząsteczce białka peroksydazy o typowej budowie hemoproteinowej, np. peroksydazy z korzenia chrzanu wynosi 0,12%. Masa cząsteczkowa peroksydazy w zależności od źródła enzymu mieści się w granicach 30 000—54 000. Białka peroksydaz roślin wyższych i grzybów zawierają stosunkowo dużo kwasu asparaginowego i glutaminowego oraz seryny i treoniny a niewiele tyrozyny i tryptofanu [51, 59, 78, 79, 97].

W oczyszczonej formie peroksydazy chrzanu (izozym katodowy), która stanowi 50% enzymu, oznaczono sekwencję aminokwasową [112, 113]. Izozym ten składa się z 308 aminokwasów i jednej grupy hamatynowej. Badany enzym zawierał osiem reszt węglowodanowych połączonych z asparaginą. N-końcowym aminokwasem jest kwas glutaminowy zablokowany w postaci pyrolidankarboksyłowej. C-końcowym aminokwasem jest seryna luźno związana z asparaginą [113].

Peroksydazy roślinne posiadają ponadto komponentę cukrową. Np. w peroksydazie z rzodkiewki japońskiej liczba reszt heksozamin wynosi 15, heksoz — 35, a pentoz — 15, na ogólną liczbę reszt aminokwasowych wynoszącą 348 [79]. Usunięcie komponenty węglowodanowej z białka peroksydazy nie wpływa na aktywność enzymu [112, 114, 115]. Węglowodany zatem nie są więc istotnym składnikiem tego enzymu.

Czynność katalityczna peroksydazy jest dość zróżnicowana. Peroksydaza z korzenia chrzanu w obecności nadtlenu wodoru może powodować demetylację metoksyfenoli jak również polimerów fenylopropanowych, jakim jest lignina, co prowadzi do tworzenia alkoholu metylowego [41]. Aktywność tę wykazuje również peroksydaza grzybowa [63]. Tworzenie metanolu jest poprzedzane utlenianiem metoksyfenoli. Powstałe wolne rodniki występują w dwóch formach mezomerycznych, które mogą stworzyć połączenia dwumetoksyfenolowe. Związek ten ulega rozpadowi i przyłączając cząsteczkę wody z jednoczesną utratą protonu powstaje przejściowe połączenie, a następnie dochodzi do oddzielenia metanolu i utworzenia o-chinonu [41].

Zaobserwowano, że peroksydaza zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* katalizuje dekarboksylację kwasu syringowego i wanilinowego [6].

Produktem dekarboksylacji kwasu syringowego jest jak stwierdzono 2,6-dwumetoksybenzochinon [6]. Peroksydaza i H₂O₂ katalizują również utlenianie kwasu wanilinowego doprowadzając do utworzenia dwu rodzajów dimerów. Jeden z nich

powstaje z jednoczesną dekarboksylacją, podczas gdy drugim produktem reakcji enzymatycznej jest kwas dehydrowanilinowy.

Peroksydaza bierze też udział w demetylacji amin. Podczas peroksydacyjnego utleniania metyloaminy powstaje formaldehyd [34]. Tlen powstającego po demetylacji amin formaldehydu pochodzi z wody [34] a nie z nadtlenuku wodoru, jak to proponowano w odniesieniu do reakcji N-demetylacji z udziałem cytochromu P₄₅₀ [81]. Omówiony schemat enzymatycznej demetylacji amin jest o tyle istotny, że wskazuje na bardziej ogólny charakter tworzenia wolnych rodników podczas oksydacyjnej N-demetylacji przy udziale zarówno peroksydazy chrzanu, jak i innych hemoprotein.

Peroksydaza wykazuje również aktywność oksydazową polegającą na zdolności do utleniania hormonu roślinnego IAA (kwas indolilo-3-octowy). Pomimo zastosowania metod rozdzielczych jak np. chromatografii [44], elektroforezy i elektroogniskowania [43, 45, 100] izoperoksydazy roślinne wykazały równocześnie zdolność utleniania IAA i innych donorów wodoru. Wydaje się zatem, że zdolność utleniania IAA jest jedną z wielu możliwych czynności cząsteczki peroksydazy. Zdolność do utleniania IAA przez preparat peroksydazy zależy jednak od źródła enzymu oraz stopnia jego oczyszczenia [44, 100]. Peroksydaza z korzenia chrzanu może, np. bez udziału H₂O₂ utleniać kwas indolilo-3-octowy [44]. Podczas gdy peroksydaza z młodych liści pszenicy utlenia IAA w obecności fenolowych kofaktorów (2,4-dwuchlorofenol, kwas p-hydroksycynamonowy) [66]. W tym przypadku dochodzi do tworzenia H₂O₂ albo rodników peroksyfenolowych, co umożliwia utlenianie IAA.

Aktywność oksydazowa peroksydazy w tkankach grzybów wykazuje pewne zróżnicowanie. W mycelium niektórych gatunków grzybów utlenianie IAA przez peroksydazę zachodzi bez udziału H₂O₂, a nadtlenek wodoru wywołuje jedynie stymulację tej aktywności [51, 52]. W grzybni *Trametes versicolor* aktywność oksydazowa peroksydazy nie daje się wykryć mimo wysokiej aktywności wobec fenoli i nadtlenuku wodoru (substratów peroksydazy) [62]. Dopiero po wstępnym oczyszczeniu enzymu stwierdzić można zdolność utleniania IAA. Byłoby to zgodne z obserwacją Hoyle [44] jak i Stoniera i in. [100] o inhibicji IAA oksydacyjnej aktywności przez substancje towarzyszące jak np. związki fenolowe obecne w materiale biologicznym.

Skopoletyna (pochodna kumaryny) okazała się allosterycznym niekompetycyjnym inhibitorem reakcji utleniania IAA przez peroksydazę z chrzanu [85]. Skopoletyna hamuje również reakcję utleniania gwajakolu. Po oddzieleniu hematyny od białka peroksydazy utlenianie IAA przebiega bez zakłóceń. Hamowana jest tylko reakcja utleniania gwajakolu. Przypuszcza się, że skopoletyna przyłącza się do białka peroksydazy w miejscu „peroksydazowym” i „oksydazowym” natomiast IAA mógłby tworzyć kompleks z białkiem tylko w miejscu „oksydazowym”. Struktura peroksydazy jest więc bardziej złożona niż wynikałoby to tylko z obecności hematyny jako centrum dominującego.

2. Kompartimentacja peroksydaz roślinnych

Do niedawna uważano, że peroksydaza występuje w komórce roślinnej przede wszystkim w formie rozpuszczalnej w cytozolu. Obecnie wiadomo, że część tego enzymu jest rozpuszczona w cytozolu zaś reszta tej aktywności izolowana z komórki pochodzi np. z przestrzeni międzykomórkowych [67] lub na skutek niewłaściwej techniki ekstrakcji ścian i błon komórkowych dostaje się do cytozolu [14]. Należy tu zwrócić uwagę, że peroksydazy roślinne wykazują szczególnie dużą heterogenność, co mogłoby tłumaczyć występowanie niektórych izoenzymów w cytozolu a innych w błonach lub ścianach komórkowych [4, 117]. W 1969 roku stwierdzono elektroforetycznie 24 izoperoksydazy w liściach kukurydzy [39], podczas gdy w 1977 roku stosując elektroogniskowanie wykryto 42 izoperoksydazy w preparatach peroksydazy z chrzanu [45]. Ze względu na tak złożony skład izoenzymowy peroksydaz wskazane było dokonanie występniej ich klasyfikacji aby następnie można było przeprowadzić porównania i ustalenia kompartimentacji poszczególnych izozymów peroksydazy.

Logiczną wydaje się wstępną klasyfikację peroksydaz na cztery grupy [68, 69, 70, 71, 80]. Grupa G_I to szybko wędrujące peroksydazy anodowe o punkcie izoelektrycznym przy pH 4—4,5, podczas gdy grupa G_{II} wykazuje punkt izoelektryczny przy pH 4,5—5,5. Grupa G_{III} (pH 6,5—7,5) i grupa G_{IV} (pH 7,5—8,5) stanowią katodowe izoperoksydazy odpowiednio wolno i szybko wędrujące podczas elektrolizy. Podziału tego dokonano na podstawie badania materiału pochodzącego z różnych tkanek tytoniu. W obrębie wymienionych grup peroksydaz stwierdza się zróżnicowanie punktu izoelektrycznego izoperoksydaz. W grupie G_I występuje sześć izoperoksydaz podczas elektroforezy na żelu poliakryloamidowym, ale tylko dwie stwierdzono w czasie elektroogniskowania. W grupie G_{II} wykryto cztery izoperoksydazy przy użyciu elektroogniskowania, natomiast trzy izoperoksydazy w czasie elektroforezy. Nie było różnic w liczbie izozymów przy zastosowaniu obu metod w grupach G_{III} (trzy izozymy) i G_{IV} (jeden izozym). Wymienione grupy peroksydaz można było izolować z komórki po konwencjonalnej homogenizacji mechanicznej, ale wtedy część peroksydaz pozostawała w błonach [69]. Ekstrakcję jonowo związanych peroksydaz ze ścian komórkowych przeprowadzono poprzez inkubację osadu po homogenizacji tkanek roślinnych z 1 M NaCl. Kowalennie związaną peroksydazę ekstrahowano następnie przy udziale celulazy i pektynoglukozydazy [7, 9, 69]. Nierozpuszczalne peroksydazy stanowią około 60% całej aktywności tego enzymu w komórce [14], chociaż Mäder [67] jest zdania, że tylko około 20% peroksydazy zawartej w komórce jest połączone ze ścianą komórkową. Peroksydazy G_{II} i G_{III} oprócz występowania w ścianach komórkowych są jeszcze zawarte w protoplaście [67]. Grupę G_I szybko wędrujących izoperoksydaz anodowych znajdowano we wszystkich składnikach komórkowych ale większość była zawarta w cytozolu. Dla bliższego ustalenia występowania tej grupy izoperoksydaz w komórce zastosowano infiltrację pod próżnią tkanek tytoniu w wodzie lub 0,2 M NaCl [67]. Po infiltracji stwierdzono obecność stosunkowo dużej ilości peroksydaz grupy G_I w tym preparacie. Wydaje się zatem, że peroksy-

dazy grupy G_1 są obecne w ścianach i błonach komórkowych oraz w przestrzeniach międzykomórkowych i poprzez swobodną dyfuzję przechodzą podczas infiltracji do roztworu. W podobnych doświadczeniach z infiltracją mycelium grzyba *Trametes versicolor* pod próżnią stwierdzono, że niewielka zmiana pH 0,02 M buforu octanowego od 5,4 do 4,0 powoduje dyfuzję peroksydazy przez błonę komórkową. Grzyby mają zdolność modyfikacji stężenia jonów wodorowych podłoża w tym zakresie pH. Sądzić zatem można, że mógłby to być również jeden z możliwych mechanizmów przenikania peroksydazy przez błony komórkowe [61]. Również w liściach soi stwierdzono peroksydazę zawartą w błonie mitochondrialnej, która łatwo przenika do cytoplazmy podczas pęcznienia mitochondrium [108].

Podczas frakcjonowanego wirowania homogenatu z korzeni soczewicy wykazano obecność aktywności peroksydazowej we frakcji rybosomalnej [83]. Okazało się, że są to trzy izoperoksydazy: dwie słabo zasadowe (katodowe) i jedna wolno wędrująca anodowa.

U roślin niższych i w mycelium grzybów z klasy *Basidiomycetes*, jak wynika ze wstępnych doświadczeń własnych, również część peroksydazy występuje w błonach komórkowych jako jonowo związane białko [62].

Obecne w błonach peroksydazy mogą pełnić odpowiednie funkcje w postaci enzymów nierozpuszczalnych. Wydaje się przy tym, że łączenie się peroksydaz z błonami i organellami komórkowymi jest procesem wybiórczym. Często obserwuje się, że w przemytych fragmentach pierwotnych ścian komórkowych roślin wyższych może być syntetyzowana lignina w obecności alkoholu koniferylowego i H_2O_2 [118]. Reakcja ta przebiega przy udziale jonowo lub kowalentnie połączonej ze ścianą komórkową peroksydazy. Peroksydaza ta stanowi składnik ściany i nie jest uwalniana podczas przemywania. Powstająca w podanych wyżej warunkach lignina zostaje połączona wiązaniami kowalencyjnymi z matrycą węglowodanową ścian komórkowych i białkami w niej zawartymi [117, 118]. Stwierdzono również, że peroksydaza przyspiesza hydroksylację proliny w białkach ścian komórkowych. Wpływa to na ich rozciągliwość regulując tym samym przepuszczalność błon komórkowych [82].

3. Warunki biosyntezy peroksydazy

Okres półtrwania mRNA specyficznego dla peroksydazy w tkankach trzciny cukrowej określono na 1,5 do 2 godzin [29]. Stwierdzono to przenosząc tkanki trzciny cukrowej ubogie w peroksydazę do wody. Wtedy następowała gwałtowna synteza peroksydazy. W warunkach intensywnej indukcji peroksydazy wprowadzono aktywnomycynę D, lub 6-metylopurynę, znane inhibitory syntezy kwasów nukleinowych, co pozwoliło wyznaczyć połowiczny czas biosyntezy specyficznego mRNA dla peroksydazy.

Każda cząsteczka peroksydazy wymaga do swej aktywności komponenty hematynowej. U roślin zielonych należało wyjaśnić zatem problem, czy droga syn-

tezy magnezoporfiryn jest identyczna ze schematem syntezy żelazoporfiryn. Enzymem bezpośrednio biorącym udział w syntezie magnezoporfiryn jest dehydrataza kwasu aminolewulinowego (EC 4.2.1.24) [50]. W beżchlorofilowych komórkach hodowli tkankowych orzecha ziemnego (*Arachis th.*) obserwowano wysoki poziom tego enzymu podobnie jak w komórkach zawierających chlorofil. Wzrost aktywności dehydratazy kwasu aminolewulinowego przebiegał równolegle podczas tego doświadczenia z syntezą peroksydazy [50]. Synteza peroksydazy mogła być jeszcze stymulowana przez wprowadzenie do hodowli tkankowych ^{14}C kwasu γ -aminolewulinowego [46, 47]. Piętno izotopowe znaleziono w izozymach peroksydazy, co wskazywałoby na wykorzystanie kwasu γ -aminolewulinowego jako prekursora układu żelazo-porfirynowego peroksydazy. Van Huystee [47] sądzi nawet, że kwas γ -aminolewulinowy poprzez swój udział w syntezie peroksydazy utrudnia syntezę chlorofilu.

4. Filogenetyczne i ontogenetyczne zmiany izozymów peroksydaz

Mimo nie całkowicie wyjaśnionej roli fizjologicznej peroksydazy sądzić można, że poprzez adaptację organizmów do środowiska zmieniały się formy oraz funkcje tego enzymu wraz z procesem ewolucyjnym. Dla określenia stopnia tych zależności oznaczono skład izozymowy peroksydaz z roślin na różnym stopniu rozwoju filogenetycznego, począwszy od glonów poprzez mszaki, paprocie, rośliny nagozalążkowe i okrytozalążkowe (jedno- i dwuliścienne). Pewne rodzaje roślin zawierają charakterystyczne izoperoksydazy o specyficznej, dla danej grupy roślin, szybkości migracji podczas elektroforezy. I tak dla przykładu badane rośliny wyższe zawierają charakterystyczną izoperoksydazę o $R_m = 0,2$. Natomiast mszaki cechuje izoperoksydaza o $R_m = 0,45$ [5]. Dane te sugerują możliwość występowania izoperoksydaz charakterystycznych dla stopnia filogenetycznego rozwoju. Drugi typ izoperoksydaz powstawałby w wyniku specyficznej adaptacji metabolicznej. Zaobserwowano również inną prawidłowość zmian aktywności peroksydazy zależną od rodzaju filogenetycznego, a mianowicie zróżnicowaną specyficzność substratową wobec donorów wodoru takich jak benzydyna, gwajakol i pirogalol. Zmienność specyficzności substratowej mogłaby stanowić informację o stadium filogenetycznym ewolucji danego gatunku roślin [31].

Oprócz zmian ilościowych w składzie izoperoksydaz roślinnych, w zależności od stadium filogenetycznego, obserwuje się powszechnie zjawisko wzrostu aktywności peroksydazy oraz zmian w liczbie izozymów podczas rozwoju ontogenetycznego. U grzybów następuje wzrost ogólnej aktywności peroksydazy oraz zmiany liczby izozymów peroksydazy (z trzech do pięciu), np. w mycelium *Inonotus radiatus* hodowanych *in vitro* [59, 60]. W warunkach naturalnych w owocnikach grzybów klasy *Basidiomycetes* wraz z wiekiem następuje wzrost aktywności niektórych izoperoksydaz jak i ich liczby [77]. *In vitro* w miarę upływu czasu hodowli

grzybni *Inonotus radiatus* na podłożu płynnym rośnie również aktywność peroksydazy wydzielonej do pożywki. Jednak nie wszystkie izozymy zawarte w mycelium przedostają się do podłoża [59, 60]. Sądzić można, że te izozymy są specyficznie syntetyzowane lub modyfikowane do czynności pozakomórkowej i do kontaktu ze środowiskiem [91]. Podobne sugestie wysunięto w przypadku peroksydazy z glonów *Nostoc* [54].

U roślin wyższych stwierdza się zarówno tkankową jak i ontogenetyczną specyficzność izoperoksydazową [73, 74, 75]. Najwyższą liczbę izozymów peroksydazy stwierdzono u kukurydzy we wczesnych stadiach wzrostu [76]. W innym materiale roślinnym podczas rozwoju nasienia jabłoni nie zmieniała się aktywność wolnowędrujących izoperoksydaz anodowych, natomiast tworzyły się *de novo* dwie szybko-wędrujące izoperoksydazy anodowe [89]. Zwracają też uwagę zróżnicowane zmiany aktywności niektórych izoperoksydaz podczas dojrzewania i starzenia się owoców. Aktywność rozpuszczalnych w cytozolu peroksydaz nie była zależna od stopnia dojrzałości owoców bananów [37]. Natomiast aktywność peroksydaz „nierozpuszczalnych” — czyli związanych ze ścianami komórkowymi, owoców banana wzrastała trzykrotnie na początku okresu dojrzewania aby zacząć spadać w czasie starzenia się tego materiału biologicznego [37].

W szpilkach świerka (*Picea abies*) obserwowano zmiany izoperoksydaz w ontogenetycznym cyklu rocznym. Wyróżniono w tym materiale dwie grupy anodowych peroksydaz. Trzy do pięciu szybko-wędrujących anodowych (gr. I), sześć do dziesięciu wolnowędrujących podczas elektroforezy (gr. II) [20]. Młode szpilki zawierały tylko grupę I izoperoksydaz. W lecie tworzą się izoperoksydazy grupy II. Grupa II izoperoksydaz z tego materiału może pełnić funkcje fizjologiczne w procesie różnicowania, biorąc udział w przemianach dojrzałych i starzejących się szpilek. Natomiast grupa II izoperoksydaz jest zaangażowana w biosyntezie ligniny we wczesnym okresie rozwoju tkanki.

Stosując kultury tkankowe epidermy tytoniu zaobserwowano, że podczas powstawania innych tkanek wegetatywnych, także korzenia i kalusa, dochodzi do zmian w rozpuszczalnych izoperoksydazach. Zmianom ulegały liczby izoperoksydaz zarówno anodowych, jak i katodowych. Aktywność ogólną peroksydazy nie zawsze odzwierciedlały zachodzące zmiany ilościowe i jakościowe izozymów podczas namnażania komórek w tkankach. Kultury tkankowe różnicujące tkankę korzeniową zawierały duże ilości izoperoksydaz w porównaniu z kulturami tkankowymi tworzącymi inne rodzaje tkanek [16]. W pierwszej fazie tworzenia korzeni występowała korelacja biosyntezy peroksydazy z lignifikacją i katabolizmem auksyn. W dalszej fazie rozwoju korzeni następował wzrost aktywności anodowych peroksydaz przy zmniejszonym przyroście aktywności izozymów katodowych [28]. Zmiany w liczbie izozymów peroksydaz i ich aktywności są, jak można sądzić, regulowane na poziomie genomu, zatem są one przyczyną różnicowania się tkanek a nie jej wynikiem [28].

Opisane zmiany łączą się z aktywnością biologiczną i poziomem hormonów roślinnych oraz ogólną zdolnością oddechową tkanek roślinnych zależną od ontogenetycznego stadium rozwojowego.

5. Zmiany genetyczne w izozymach peroksydaz

Wyniki kilkuletnich badań nad izoperoksydazami w kilku odmianach kukurydzy przedstawił Marsalek [73, 74, 75, 76]. Badano pierwszy, drugi i trzeci liść oraz rośliny w okresie dojrzewania nasion przeprowadzając krzyżówki genetyczne i pokoleniowe F_1 i F_2 . Spektrum izoperoksydaz wykazuje specyficzność genotypową, tkankową i ontogenetyczną [76]. We wszystkich badanych genotypach przeważają peroksydazy katodowe. Hybrydy wykazują zróżnicowanie w liczbie izozymów peroksydazy w porównaniu z formami rodzicielskimi [75]. W odmianach zmutowanych niektóre izozymy peroksydazy zanikają a powstają inne [74]. Marsalek [74] analizując własne doświadczenia polowe stwierdził tendencje do predominacji spektrum izozymowego jednej linii genetycznej i kodominacji w innych genotypach. Uzyskane wyniki jak i wykazane u wątrobowców możliwości klasyfikacji gatunku na podstawie składu izozymowego peroksydaz mogłyby stanowić wygodny test taksonomiczny [53, 76].

U większości roślin stwierdza się obecność trzech grup peroksydaz (dwie anodowe i jedna katodowa) [96] lub czterech grup (dwie anodowe i dwie katodowe) [69]. Grupy te różnią się od siebie znacznie właściwościami np. punktem izoelektrycznym sugerującym różny skład aminokwasowy cząsteczek białkowych [69]. Wskazywałoby to na kodowanie tych grup peroksydaz przez odrębne geny. Wewnątrz grup obserwuje się dalsze zróżnicowanie na izoenzymy, które mają zbliżoną strukturę pierwszorzędową umożliwiającą, być może, wykorzystanie tej samej matrycy RNA do ich syntezy [96]. Udało się w kilku przypadkach ustalić geny kontrolujące syntezę peroksydaz [10, 21, 39], przy czym niektóre wykryte „loci” kodują oprócz peroksydazy również inne enzymy np. fosfatazy i esterazy [87].

Szerszy pogląd na to zagadnienie przedstawił Tyson i in. [107]. W odmianach genomorficznych lnu „L” i „S” zajęto się tylko dwoma izoperoksydazami anodowymi (R_m 0,074 i 0,16). Obie te formy w badanych odmianach były kontrolowane przez dominujące i recesywne allele. Odmiana lnu „L” była homozygotą dominującą. Stwierdzono molekularne różnice pomiędzy badanymi dwoma peroksydazami w odmianach „L” i „S”. Różnica polegała na zawartości komponenty węglowodanowej w izozymie o R_m 0,074 i 0,16, przy zbliżonych masach cząsteczkowych. W obu odmianach lnu „L” i „S” izozym peroksydazy o R_m 0,074 zawierał 24% węglowodanów a izozym o R_m 0,16 — 14% komponenty węglowodanowej. Znaczny procent węglowodanów w badanych izozymach peroksydazy z lnu wykazuje, że synteza cząsteczki peroksydazy jest w dużym stopniu uzależniona od genów zaangażowanych w syntezie białek katalizujących przemianę węglowodanów. Drugi zespół genów był odpowiedzialny za efektywną syntezę białka peroksydazy. Budowa peroksydazy wykazuje zatem, że co najmniej trzy systemy genów strukturalnych są odpowiedzialne za biosyntezę peroksydazy.

6. Wpływ hormonów na aktywność peroksydaz roślinnych

Większość hormonów roślinnych regulując wzrost roślin może regulować biosyntezę peroksydaz [33]. I tak np. giberelina (GA_3) i benzyladenina stymulowały aktywność grupy szybkowędrujących izozymów anodowych. Sądzić można, że są to izoperoksydazy biorące udział w procesie rozwoju zarodków jabłoni [89]. Kwas indolino-3-octowy nie wywierał wpływu w tym doświadczeniu. IAA jak się okazuje, reguluje poziom aktywności dwu izoperoksydaz katodowych związanych z rybosomami [22, 83]. Efekt działania IAA na peroksydazę może być wyjaśniony poprzez jego działanie na poziomie ekspresji genu właściwego dla tych peroksydaz. Nie jest to jednak działanie wybiórcze, gdyż IAA wyzwała również biosyntezę innych białek w komórce [22, 83, 98]. Jednocześnie nie należy zapominać o możliwości katalizowania przez peroksydazę utleniania IAA. Ilość IAA w komórkach roślinnych zależna jest od stopnia wzrostu i rozwoju, a także mogłaby być regulowana przez ten rodzaj aktywności peroksydazy [43, 45, 86, 101]. Ilość endogennego IAA wzrasta w strefie uszkodzenia tkanek, ponieważ jest to konieczne do ekspresji wzrostu komórek. IAA w tym czasie kontroluje aktywność peroksydazy, co potwierdzono podając IAA z zewnątrz. Gdy ilość IAA spada do poziomu fizjologicznego zaczyna wzrastać aktywność peroksydazy [12]. Nie jest więc całkiem jasne czy spadek zawartości IAA w komórkach jest wywołany obecnością peroksydazy, czy też na skutek zmniejszenia stężenia IAA jest możliwa przyspieszona synteza peroksydazy [2]. Bez względu jednak na zależność przyczynową w tym względzie izoperoksydazy anodowe, które jak stwierdzono wykazują aktywność IAA oksydazową mogą być enzymem kontrolującym wzrost i zmiany morfologiczne w komórce poprzez regulację poziomu IAA [101, 107].

U roślin niższych, np. u grzybów, nie stwierdzono obecności cytokinin ani auksyn [52]. Jednak IAA jest niezbędny zwłaszcza do wzrostu sporangioforów [12]. Trudno sobie wyobrazić aby IAA był jedynym czynnikiem hormonalnym roślin niższych. Można zatem sądzić, że niektóre związki fenolowe szeroko rozpowszechnione w przyrodzie pełniłyby bezpośrednio lub pośrednio funkcje regulacyjne w tych organizmach [57, 58, 64, 105]. Jak wykazano w doświadczeniach własnych, kwas ferulowy i wanilinowy indukują aktywność niektórych izoperoksydaz wpływając na aparat biosyntezy białka grzybów z klasy *Basidiomycetes*. Z sześciu izoperoksydaz zawartych w mycelium *Trametes versicolor* dwie są indukowane przez te fenole wykazując jednocześnie najwyższe powinowactwo wobec induktorów [61, 65]. Jednocześnie peroksydazy grzybowe mogą inaktywować np. IAA poprzez jego utlenianie, co mogłoby stanowić istotny efekt patogenny tych organizmów wobec roślin wyższych [43, 86].

Kolejnym hormonem roślinnym, któremu przypisuje się zdolność indukcji peroksydazy jest etylen. W celu wyjaśnienia istoty działania etylenu na aktywność peroksydazy poddawano działaniu tego związku w stężeniu 1 μ l/litr skrawki batatów. Obserwowano nie tylko wzrost ogólnej aktywności peroksydazy w tym materiale ale również znaczny wzrost aktywności wszystkich izozymów i zawartej w nich ^{14}C leucyny. Blastocydyna S hamowała biosyntezę peroksydazy i inkorporo-

rację ^{14}C leucyny w obecności etylenu. Wskazywałoby to więc na syntezę *de novo* peroksydazy pod wpływem etylenu [95]. Równocześnie etylen syntetyzowany jest w małych ilościach we wszystkich tkankach roślinnych z metioniny przy udziale peroksydazy i H_2O_2 [72], zmniejsza on odporność roślin na zakażenie patogenne. Rośliny łatwo ulegające zakażeniu tworzą dużo więcej etylenu niż rośliny odporne na zakażenie [94]. Wpływ etylenu na aktywność peroksydazy nie jest jednoznaczny. W batatach powodował on stymulację aktywności tego enzymu podczas gdy w tkankach tytoniu oraz w korzeniach marchwi nie zmieniał poziomu aktywności peroksydazy [9]. W dalszych badaniach Bireckiej i Millera [9] stwierdzono, że etylen w zakresie stężeń $5\text{--}80 \mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$ hamuje wydłużanie międzywęzła u grochu i stymuluje ich pęcznienie, ale nie zmienia w istotny sposób aktywności peroksydazy [14]. Stwierdzone różnice ilościowe w aktywności peroksydazy zależne są raczej od wieku rośliny niż od poziomu gibereliny (GA_3), czy etylenu [88]. Ostrożniej jest więc uznać wpływ etylenu na aktywność peroksydazy jako efekt uszkodzenia chemicznego tkanek, który manifestuje się na przykład w pobliżu miejsc zranienia tkanki, przez wzrost aktywności niektórych katodowych i anodowych peroksydaz [1, 25]. To zróżnicowane działanie etylenu zależy także od rodzaju rośliny czy też użytej tkanki [14, 17, 38].

7. Rola fizjologiczna peroksydaz

Aktywność peroksydazy wyrażana przez utlenianie związków o charakterze fenoli, metoksyfenoli i pochodnych fenylopropanu z udziałem H_2O_2 zwraca w pierwszym rzędzie uwagę na możliwość udziału peroksydazy w procesie lignifikacji i delignifikacji. H_2O_2 konieczny do działania peroksydazy jest obecny w dużych ilościach np. w ksylemie i korze drzew [92]. Peroksydaza ze ścian komórkowych chrzantu może również katalizować tworzenie H_2O_2 w obecności $\text{NADPH} + \text{H}$ [19] lub $\text{NADH} + \text{H}^+$ [36]. Wobec tego aktywne działanie peroksydazy w warunkach biologicznych jest możliwe.

Lignina stanowi 20—35% ścian komórkowych drzew liściastych i szpilkowych. Dalsza część ścian zbudowana jest w 40% z celulozy i w 30% z chemiceluloz. Lignina jest heteropolimerem związków pochodnych alkoholu cynamonowego [33]. Dwa enzymy uważane są za podstawowe w przemianach ligniny, są to: lakaza (EC 1.10.3.2) i peroksydaza (EC 1.11.1.7) [35, 40, 103, 104, 105]. Nie wszystkie izozymy peroksydazy biorą udział w tych procesach ze względu na ich lokalizację w komórce. Wyłączone są z aktywności lignolitycznej peroksydazy zawarte w błonie mitochondrialnej [108] i w rybosomach [83]. Peroksydazy zawarte w ścianach komórkowych i przestrzeniach międzykomórkowych stanowią podstawową grupę izozymów aktywnych w reakcjach utleniania, demetylacji lub dekarboksylacji metoksyfenoli [6, 41, 42, 69, 104] i powstawania aktywnych rodników [13, 122, 123] umożliwiających zarówno rozkład ligniny, jak i przemiany odwrotne — syntezy nierozpuszczalnych fenylopropanowych polimerów.

Jest możliwe, że podczas degradacji ligniny wywołanej przez grzyby, aldehyd

wanilinowy powstaje z kwasu wanilinopirogronowego przy udziale peroksydazy i H_2O_2 . Tworzący się aldehyd charakteryzuje się stanem elektronowo wzbudzonym [123]. Dalszą konsekwencją tego wniosku byłaby sugestia, że aromatyczne pirogroniany byłyby nośnikami energii w systemach biologicznych. Podobny elektronowo wzbudzony stan mógłby powstawać z aldehydów aromatycznych, takich jak aldehyd indolilo-octowy lub aldehyd acetofenyłowy [49, 121]. Wówczas rola peroksydazy w procesach rozkładu ligniny miałyby szczególnie duże znaczenie fizjologiczne.

Czy w procesie tym biorą udział tylko peroksydazy anodowe trudno w tej chwili dać jednoznaczną odpowiedź, mimo sugestii Gaspara i in. [26, 27]. U grzybów nadrzewnych występują peroksydazy anodowe o wysokiej specyficzności substratowej wobec monomerów ligniny [65]. Peroksydazy te są indukowane przez fenole takie jak kwas ferulowy i wanilinowy oraz związki lignino-pochodne (kwas ligno-sulfonowe [61]. Sugerowałoby to udział tej grupy izoform peroksydazy w odbudowie ligniny roślin wyższych. Jest to możliwe dzięki swobodnemu przenikaniu niektórych peroksydaz przez błony, a wtedy enzym wykazywałby aktywność w środowisku poza komórką [55, 59, 61]. Produkty rozkładu ligniny mogłyby być następnie przyswajane przez grzyby.

W młodych i rozwijających się tkankach roślin wyższych gdzie intensywność lignifikacji jest niewielka równocześnie obserwuje się obniżony poziom aktywności anodowych izoform peroksydazy [102]. W miarę dojrzewania tworzona jest lignina w ścianach komórek miękiszu i równolegle wzrasta aktywność nierozpuszczalnych form peroksydazy [4]. Peroksydazy te katalizują reakcję tworzenia silnych wiązań pomiędzy monomerami ligniny i polisacharydami budując od podstaw strukturę lignino-celulozową komórki [116, 118]. Niejednokrotnie wzrost procesu lignifikacji może być wywołany przez uszkodzenie lub infekcję bakteryjną lub wirusową tkanki roślinnej i w tym przypadku zachodzi indukcja syntezy peroksydazy oraz takich enzymów jak amoniako-liaza fenyloalaniny (PAL), ligaza kwasu hydroksycynamonowego i CoA (EC 6.2.1.12) a więc enzymów szeregu przemian związków fenolowych [111]. W związku z tą obserwacją sugeruje się udział w lignifikacji nie pojedynczych enzymów ale kompleksów enzymatycznych [35, 110]. PAL i ligaza, kwasu hydroksycynamonowego katalizują reakcje tworzenia fenoli z fenyloalaniny. Natomiast pierwszym etapem utleniania fenoli przy udziale peroksydazy jest szybkie jednoelektronowe utlenianie substratów (donorów wodoru), tworzenie rodników fenoksy i wreszcie chinonów. Reakcje te mogą być pośrednią drogą transformacji ligniny w związki humusowe (próchnicowe) w glebie [122].

Zakażenie roślin wyższych czynnikami patogennymi (grzyby, bakterie) wywołuje zmiany w poziomie aktywności peroksydazy [99]. Zarówno w odmianach wrażliwych na zakażenie jak w odmianach odpornych aktywność peroksydazy rośnie [3, 94]. Nie wszystkie izozymy peroksydaz zwiększają swą aktywność podczas zakażenia. Można by to wyjaśnić poprzez bezpośrednie hamujące działanie niektórych izoperoksydaz na wzrost organizmów patogennych np. grzybów [94]. Odporność na choroby wzrasta gdy organizm zabezpieczy się tworząc odpowiednią ilość ligniny w komórce, co wpływa uszczelniająco na ściany komórkowe. Ligni-

fikacja w szczepach roślin odpornych jest szybsza i koncentruje się w środku miejsca zakażenia. W szczepach wrażliwych na zakażenie lignifikacja postępuje wolniej, a rozwój czynników patogennych stwierdzono również poza miejscem zakażenia [35, 84, 111]. Gdy tkankę poddano działaniu inhibitora syntezy białka (cykloheksimid) synteza ligniny i enzymów związanych z lignifikacją była hamowana a tkanki z łatwością ulegały zakażeniu grzybowemu [111]. Birecka i in. [8] zwracają jednak uwagę na często nieostrożną interpretację działania cykloheksimidu, znanego inhibitora biosyntezy białka. Cykloheksimid w pewnych stężeniach może modyfikować metabolizm komórki ograniczając odporność organizmu na zakażenie [8].

Peroksydaza może zwiększać odporność roślin wyższych na zakażenia również bakteryjne [109]. Stwierdzono, że peroksydaza z chrzanu w obecności nadtlenu wodoru i jodku potasu hamuje wzrost bakterii będących czynnikiem patogennym fasoli (*Xantomonas phaseoli* var. *sojensis*). Po 30 minutach inkubacji z enzymem i nadtlaniem wodoru obserwuje się spadek ilości żywych komórek z 10^6 do 10^4 /ml. Działanie peroksydazy mogły wzmacniać fenole utleniane do chinonów [122]. Powstające chinony poza działaniem bakteriobójczym inaktywują również RNA wirusów roślinnych [109]. Powszechnie występująca u roślin oksydaza kwasu askorbinowego utleniając swój substrat tworzy H_2O_2 , niezbędny do działania peroksydazy [108]. Zespół — peroksydaza fenole i H_2O_2 obecne w komórkach roślin wyższych stanowi więc jak się wydaje jeden z fizjologicznych mechanizmów ochrony roślin przed zakażeniem.

8. Uwagi końcowe

Peroksydazy to enzymy nie tylko szeroko rozpowszechnione u roślin ale również wykazujące złożoną budowę izozymową. W ostatnich latach zaznaczył się duży postęp w badaniach nad tym enzymem, co rozszerza wiadomości zarówno o strukturze jak i o właściwościach fizyko-chemicznych i biologicznych tego enzymu.

Funkcja fizjologiczna peroksydazy, która jednocześnie wykazuje aktywność oksydazy kwasu indolilo-3-octowego jest złożona i nie w pełni jasna. Dość szeroko poznano rolę peroksydazy w lignifikacji i delignifikacji. Aktywność peroksydazy jest istotna w czasie stanów stresowych i podczas zakażeń patogenami roślin wyższych. Synteza peroksydazy może być regulowana przez hormony roślinne, ale również i peroksydaza może wpływać na poziom niektórych hormonów roślinnych.

LITERATURA

- [1] Abeles F. B., 1972. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 23, 259—292.
- [2] Addicott F. T., 1970. *Biol. Rev.*, 45, 485—524.
- [3] Aksenowa V. A., Kozhanowa O. N., 1976. *Fizjologia Rastlienii*, 23, 391—396.
- [4] Anzai T., 1975, *J. Exp. Bot.*, 26, 589—595.

- [5] Bakardijewa N. T., 1976. *Compt. Rend. de L'Acad. Sci., Bulgarie*, 20, 1191—1194.
- [6] Berlin J., Barz W., 1975. *Naturforsch.*, 30 c, 650—658.
- [7] Birecka H., Catalfamo J. L., Garraway M. O., 1975. *Plant Physiol.*, 55, 607—610.
- [8] Birecka H., Garraway M. O., 1978. *Plant Physiol.*, 6, 561—566.
- [9] Birecka H., Miller A., 1974. *Plant Physiol.*, 53, 569—574.
- [10] Brewbaker J. L., Hasegawa Y., 1975. *Isozymes III. „Developmental Biology.*, C. L. Markert, ed. Acad. Press. New York, str. 659—673.
- [11] Brignac P. J. (Jr.), Tien-Hua Yu., 1975. *Anal. Letters*, 8, 315—322.
- [12] Bürstell M., Hilgenberg W., 1975. *Biol. Zentralbl.*, 94, 389—400.
- [13] Caldwell E. S., Steelink C., 1969. *Biochim. Biophys. Acta*, 184, 420—431.
- [14] Catalfamo J. L., Feinberg J. H., Smith G. W., Birecka H., 1978. *J. Exp. Bot.*, 29, 347—358.
- [15] Chance B., 1949. *Arch. Biochem. Biophys.*, 22, 224—228.
- [16] Chandra G. R., Gregory L. E., Worley J. F., 1971. *Plant Cell Physiol.*, Tokyo, 12, 317—324.
- [17] Czapski J., 1973. *Proc. Res. Inst. of Pomology, Skierniewice, Poland, Ser. E.*, 3, 307—314.
- [18] Danner D., Brignac P., Aeceneaux D., 1973. *Arch. Biochem. Biophys.*, 156, 759—763.
- [19] Elstner E. F., Hempel A., 1976. *Planta*, 130, 175—180.
- [20] Esterbauer H., Grill D., Zotter M., 1978. *Biochem. Physiol Pflanzen.*, 172, 155—159.
- [21] Felder M. R., 1976. *J. Heredity*, 67, 39—42.
- [22] Filner P., Varner J. E., 1967. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 58, 1520—1528.
- [23] Fox L. R., Purves W. K., 1968. *Plant Physiol.*, 43, 454—458.
- [24] Fromm H. J., 1967. *Biochem. Biophys. Acta*, 139, 221—230.
- [25] Gaspar T., Goren P., Huberman M., Dubuy M., 1978. *Plant and Cell Environment*, 1, 225—230.
- [26] Gaspar T., Penol C., Greppin H., 1975. *Plant Biochem. J.*, 2, 33—47.
- [27] Gaspar T., Teppaz-Misson C., Courduroux J. C., 1973. *Biol. Plantarum*, 15, 229—345.
- [28] Gaspar T., Thorpe T. A., 1977. *Acta Horticultureae*, 78, 61—73.
- [29] Gayer K. R., Glasziou K. T., 1968. *Phytochem.*, 7, 1247—1251.
- [30] George P., 1953. *Biochem. J.*, 55, 220—232.
- [31] Georgiew C. Ch., Bakardijewa N. T., Georgiew G. J., 1977. *Fizjologia Rastienii*, 24, 97—102.
- [32] Gibson D. M., Liu E. H., 1978. *Arch. Biochem. Biophys.*, 186, 317—323.
- [33] Goodwin T. W., Mercer E. J., 1972. *Introduction to plant biochemistry*, Pergamon Press, Oxford, str. 324.
- [34] Griffin B. W., 1978. *Arch. Biochem. Biophys.*, 190, 850—853.
- [35] Grisebach H., 1977. *Naturwissenschaften*, 64, 619—625.
- [36] Gross G. G., 1977. *Phytochem.*, 16, 319—325.
- [37] Haard N. F., 1973. *Phytochem.*, 12, 555—560.
- [38] Haard N. F., Marshall M., 1976. *Physiological Plant Physiol.*, 8, 195—205.
- [39] Hamill D. E., Brewbaker J. L., 1969. *Physiol. Plant.*, 22, 945—958.
- [40] Harkin J. M., Obst I. R., 1973. *Science*, 180, 296—299.
- [41] Harkin J. M., Obst I. R., 1974. *Tappi*, 57, 118—121.
- [42] Hartenstein R., Neuhauser E. F., Milligan R. M., 1977. *Phytochem.* 116, 1855—1857.
- [43] Hilgenberg W., Hanke R., 1978. *Z. Pflanzenphysiol.*, 86, 207—215.
- [44] Hoyle M. C., 1972. *Plant Physiol.*, 50, 15—19.
- [45] Hoyle M. C., 1977. *Plant Physiol.*, 60, 787—793.
- [46] Van Huystee R. B., 1976. *Can. J. Bot.*, 54, 876—880.
- [47] Van Huystee R. B., 1977. *Can. J. Bot.*, 55, 1340—1344.
- [48] Job D., Ricard J., 1975. *Arch. Biochem. Biophys.*, 170, 427—437.
- [49] Kenten R. H., 1953. *Biochem. Z.*, 55, 350—360.
- [50] Kossatz V. C., Van Huystee R. B., 1976. *Can. J. Bot.*, 54, 2089—2094.
- [51] Krüger G., Pfeil E., 1976. *Arch. Microbiol.*, 109, 175—179.
- [52] Krupasagar V., Segueira L., 1969. *Am. J. Bot.*, 56, 390—397.
- [53] Krzakowa M., Szweykowski J., 1977. *Bull. Soc. An. Sci. Lett., Poznań.*, 17D, 33—36.
- [54] Kuzmienko M. J., Stanoszewskaja T. D., 1977. *Hydrobiologičeskij Žurnal*, 13, 67—73.

- [55] Legrand B., Bubojs J., 1977. *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D.*, 285, 661—664.
- [56] Leigh J. S., Maltempo M. M., Ohlson P. I., Paul K. G., 1975. *FEBS Letters*, 51, 304—308.
- [57] Leonowicz A., Trojanowski J., 1975. *Acta Biochim. Polon.*, 22, 291—295.
- [58] Leonowicz A., Trojanowski J., Nowak H., 1972. *Microbios (Cambridge)*, 6, 23—28.
- [59] Łobarzewski J., 1974. *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Sec. C., Lublin*, 29, 41—57.
- [60] Łobarzewski J., 1974. *Acta Microbiol. Polon., Ser. B.*, 6, 1—7.
- [61] Łobarzewski J., 1980. *Int. J. Biol. Macromol. (w druku)*.
- [62] Łobarzewski J. (dane niepublikowane).
- [63] Łobarzewski J., Leonowicz A., 1979. *Special FEBS Meeting on Enzymes*, 17—21 april, Dubrownik-Cavtat, Jugosławia.
- [64] Łobarzewski J., Sikora A., 1972. *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Sec. C. Lublin*, 27, 87—98.
- [65] Łobarzewski J., Trojanowski J., 1979. *Acta Biochim. Polon.*, 26, 309—317.
- [66] Machackova J., Ganceva K., Zmrhal Z., 1975. *Phytochem.*, 14, 1251—1254.
- [67] Mäder M., 1976. *Planta*, 131, 11—15.
- [68] Mäder M., Bopp M., 1976. *Planta*, 128, 247—253.
- [69] Mäder M., Meyer Y., Bopp M., 1975. *Planta*, 122, 259—268.
- [70] Mäder M., Meyer Y., Bopp M., 1976. *Planta*, 129—33—38.
- [71] Mäder M., Nessel A., Bopp M., 1977. *Zeitschr. Pflanzenphys.*, 82, 247—260.
- [72] Mapson L. W., Wardale D. A., 1968. *Biochem. J.*, 107, 443—450.
- [73] Marsalek L., 1973. *Acta Univ. Agriculturae, Brno*, 21, 550—553.
- [74] Marsalek L., 1975. *Acta Univ. Agriculturae, Brno*, 22, 451—460.
- [75] Marsalek L., 1976. *Acta Univ. Agriculturae, Brno*, 24, 119—205.
- [76] Marsalek L., 1977. *Acta Univ. Agriculturae, Brno*, 25, 19—32.
- [77] Melniczuk G. G., Dudczenko L. G., 1976. *Ukrainskij Botaniceskij Žurnal*, 33, 252—256.
- [78] Morita Y., Shimizu K., Kada N., 1968. *Agr. Biol. Chem.*, 32, 671—677.
- [79] Morita Y., Yoshida C., 1970. *Agr. Biol. Chem.*, 34, 591—598.
- [80] Nessel A., Mäder M., 1977. *Zeitschr. Pflanzenphysiol.*, 82, 243—246.
- [81] Nordbloom G. D., Coon M. J., 1976. *Arch. Biochem. Biophys.*, 180, 343—347.
- [82] Oliveira L., Bisalputra T., 1976. *Can. J. Bot.*, 54, 913—922.
- [83] Penon P., Cecchini J. P., Miassod R., Ricard J., Teissere M., Pinna M. H., 1970. *Phytochem.*, 9, 73—86.
- [84] Poulton J., Halbrock K., Grisebach H., 1976. *Arch. Biochem. Biophys.*, 176, 449—455.
- [85] Reigh D. L., Smith E. L., 1977. *Experientia*, 33, 1451—1459.
- [86] Ricard J., Job D., 1974. *Eur. J. Biochem.* 44, 359—374.
- [87] Rick C. M., Zobel R. W., Fobes J. F., 1974. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 71, 835—839.
- [88] Ridge I., Osborne D. J., 1970. *J. Exp. Bot.*, 21, 720—734.
- [89] Rychter A., Lewak S., 1971. *Phytochem.*, 10, 2609—2613.
- [90] Saunders B. C., Holmes-Siedle A. G., Stark B. P., 1964. *Peroxidase*, Butterworths, London.
- [91] Schanel L., Blaich R., Esser K., 1971. *Arch. Mikrobiol.*, 77, 140—150.
- [92] Sagisaka S., 1976. *Plant Physiol.*, 57, 308—312.
- [93] Scheiter A., Lanir A., Epstein N., 1976. *Arch. Biochem. Biophys.*, 174, 36—44.
- [94] Seevers P. M., Daly J. M., Catedral F. F., 1971. *Plant Physiol.*, 43, 353—360.
- [95] Shanon L. M., Uritani I., Imaseki H., 1971. *Plant Physiol.*, 47, 493—498.
- [96] Shih J. H. C., Shannon L. M., Kay E., Lew J. Y., 1971. *J. Biol. Chem.*, 246, 4546—4551
- [97] Shimizu K., Morita Y., 1966. *Agr. Biol. Chem.*, 30, 149—154.
- [98] Siegel B. Z., Galston A. W., 1967. *Plant Physiol.*, 42, 221—226.
- [99] Stahman M. A., Demorest D. M., 1973. *Fungal Pathogenicity and the Plant's Response.*, ed. R. Byrde, C. Cutting, Acad. Press., New York, str. 405—420.
- [100] Stonier T., Stasinis S., Murthy Reddy K. B. S., 1979. *Phytochem.*, 18, 25—28.
- [101] Stuber C. W., Levings C. S., 1969. *Crop. Sci.*, 9, 415—416.
- [102] Thorpe T. A., Gaspar T., 1978. *In Vitro*, 14, 523—526.
- [103] Trojanowski J., 1967. *Postępy Mikrobiologii*, 6, 151—171.
- [104] Trojanowski J., 1969. *Int. Biodet. Bull.*, 5, 119—124.

- [105] Trojanowski J., Leonowicz A., Hampel B., 1966. *Acta Microbiol. Polon.*, 15, 17—22.
- [106] Trojanowski J., Leonowicz A., Wojtaś M., 1967. *Acta Microbiol. Polon.*, 15, 215—222.
- [107] Tyson H., Taylor S. A., Fieldes M. A., 1978. *Heredity*, 40, 281—290.
- [108] Urs N. V. R. R., Dunleavy J. M., 1974. *Crop Science*, 14, 740—744.
- [109] Urs N. V. R. R., Dunleavy J. M., 1975. *Phytochemistry*, 65, 686—690.
- [110] Vance C. P., Anderson J. O., Sherwood R. T., 1976. *Plant Physiol.*, 57, 920—923.
- [111] Vance C. P., Sherwood R. T., 1976. *Plant Physiol.*, 57, 915—920.
- [112] Welinder K. G., 1972. *FEBS Letters*, 30, 243—245.
- [113] Welinder K. G., 1976. *FEBS Letters*, 72, 19—23.
- [114] Welinder K. G., Smillie L. B., 1972. *Can. J. Biochem.*, 50, 63—90.
- [115] Welinder K. G., Smillie L. B., Schonbaum G. R., 1972. *Can. J. Biochem.*, 50, 44—62.
- [116] Whitmore F. W., 1976. *Phytochem.*, 15, 375—378.
- [117] Whitmore F. W., 1978. *Phytochem.*, 17, 421—426.
- [118] Whitmore F. W., 1978. *Plant Sci. Lett.*, 13, 241—245.
- [119] Williams R. J. P., Wright P. E., Mazza G., Ricard J. R., 1975. *Biochem. Biophys. Acta*, 412, 127—147.
- [120] Wilson J. M., Wong E., 1976. *Phytochem.*, 15, 1333—1341.
- [121] Yeh R., Hamphill D. (Jr.), Sell H. M., 1970. *Biochemistry*, 9, 4229—4232.
- [122] Young M., Steelink C., 1973. *Phytochem.*, 12, 2851—2861.
- [123] Zinner K., Duran N., Vidigal C. C., Yoshaki Shimizu., Cilento G., 1976. *Arch. Biochem. Biophys.*, 173, 58—65.

Dr JERZY ŁOBARZEWSKI

Zakład Biochemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej,

Pl. M. Curie-Skłodowskiej 3, 20-031 Lublin