

EDMUND NOWACKI, WIESŁAW PRUS-GŁOWACKI

## ANALIZY BIOCHEMICZNE W BOTANICE EKSPERYMENTALNEJ I GENETYCE BIOCHEMICZNEJ

Motto:

*Hombres científicos que acusais a Mc Nair sin razón  
Sabiendo que sois la ocasion de'lo mismo que culpais*

N. T. Mirov

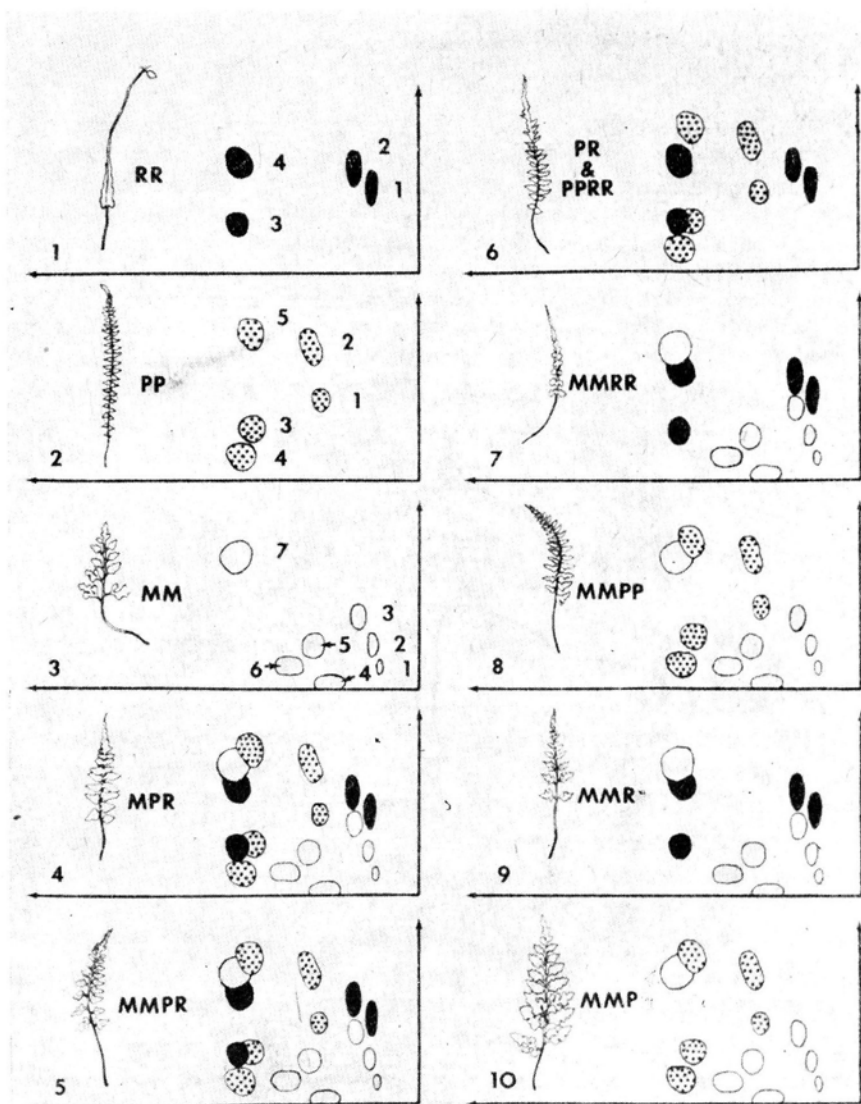
(Parafraza Juana Inez de la Gruz)

Systematyk roślin jest w trudnej pozycji człowieka, który mieszka w niewykończonym domu i to w dodatku w domu, który zdaje się nigdy nie zostanie wykończony. To zdanie E. Andersona, które cytujemy za N. T. Mirovem najlepiej oddaje stosunki panujące w taksonomii roślin. Każdy system jaki stworzy się w oparciu o jakąkolwiek cechę czy zespół cech, morfologicznych, cytologicznych, czy jeszcze innych staje się nieaktualny w momencie publikacji i żaden z nich nie oddaje rzeczywistych stosunków pokrewieństwa. Stąd też poszukiwania coraz do dokładniejszych metod określania rzeczywistych pokrewieństw. Uważa się, że dobrymi cechami mogą być pewne właściwości biochemiczne. Tu jednak podobnie jak przy systematyce opartej o cechy morfologiczne zależnie od doboru cech i nadania im odpowiedniej rangi ważności, możemy stworzyć wiele systemów. Chociaż należy się zgodzić ze zdaniem Mc Naira, że ogólnie biorąc ewolucje substancji chemicznych w roślinach następowały zgodnie z ewolucją morfologiczną.

Badania chemotaksonomiczne nabierają ostatnio znaczenia szczególnie w farmakologii oraz w badaniu gatunków uprawnych powstałych na drodze introgresywnego krzyżowania.

### A. Metody chromatograficzne

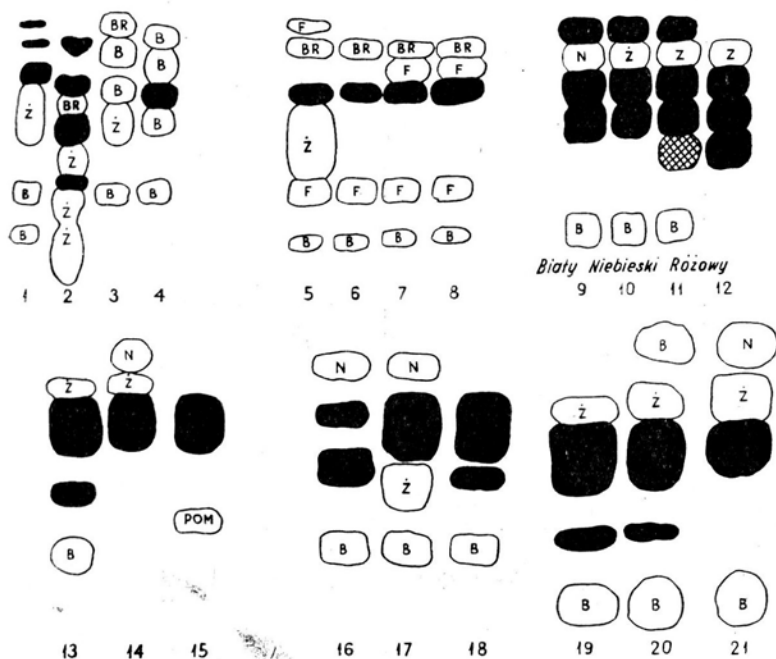
Znane są liczne przykłady spontanicznego krzyżowania się roślin, w niektórych przypadkach dotyczy to nawet bardzo odległych gatunków. Badania powstających populacji mieszańcowych wymagają często stworzenia indeksu cech morfologicznych jakie występują w wyjściowych gatunkach i w mieszańcowym potomstwie.



Ryc. 1. Schematyczne przedstawienie dwukierunkowych chromatogramów gatunków *Asplenium* i mieszańców. Każdy schemat jest opatrzony rysunkiem reprezentującym typowe liście i symbolem genomu. 1. *Asplenium rhicophyllum*, 2. *A. platyneuron*, 3. *A. montanum*, 4. *A. x kentuciense*, 5. *A. x gravessi*, 6. *A. x ebenoides* (2n) i *A. ebenoides* (4n), 7. *A. pinnatifidum*, 8. *A. bradleyi*, 9. *A. x trudellii*, 10. *A. x wherryi* (wg Smith i Levin, 1963)

Ponieważ wiele cech morfologicznych dziedziczy się pośrednio, analiza dynamiki krzyżowania się nie może być precyzyjna. Aby zaradzić tej trudności wielu amerykańskich botaników zaakceptowało proste metody chromatograficzne do badania naturalnych populacji mieszańcowych. Badania te zostały rozpoczęte i szeroko rozwinięte w Ameryce Północnej. Spowodowane to zostało specyficzną właściwością

flory amerykańskiej. Flora Ameryki Północnej podobnie jak flora europejska jest w większej swojej części względnie młoda, gdyż na obecnych swoich stanowiskach gatunki znalazły się dopiero po ustąpieniu lodowca. W przeciwieństwie jednak do flory europejskiej brak równoleżnikowych gór nie spowodował zdziśiatkowanie gatunków. Wobec tego większość rodzajów w Ameryce reprezentowane jest przez kilka lub nawet kilkadziesiąt gatunków, gatunki te często się krzyżują stwarzając duże trudności dla systematyków, stąd częste zjawisko w amerykańskich pracach



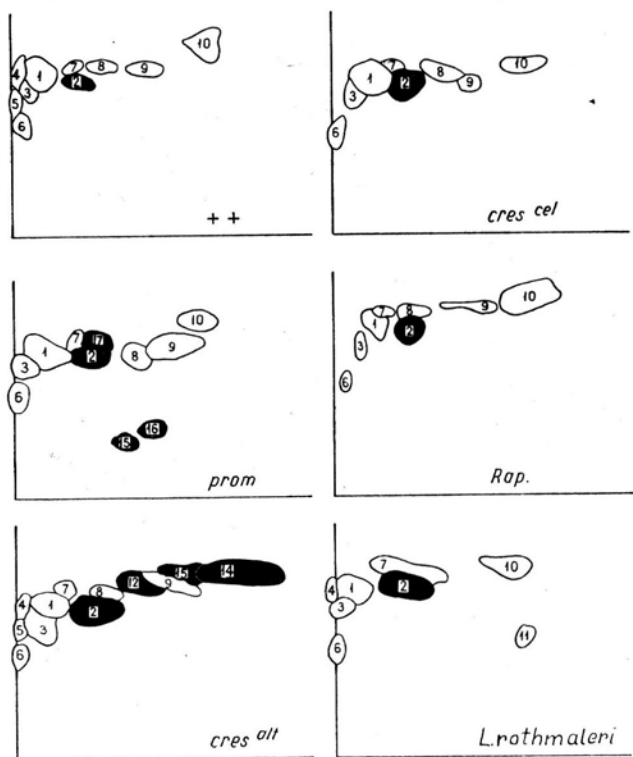
Ryc. 2. Jednokierunkowe chromatogramy związków „fenolowych” w czystych gatunkach i mieszańcach  $F_1$  łubinu. 1. *L. angustifolius*, 2. *L. albus*, 2. *L. luteus*, 4. *L. digitatus* nie krzyżują się między sobą, ani z pozostałymi gatunkami. 5. *L. palestinus* krzyżuje się, dając niepłodne  $F_1$  z 6. 7. i 8. *L. pilosus* o kwiatach białych, różowych i niebieskich, 9. 10. i 11. *L. mutabilis* o kwiatach białych, różowych i niebieskich i 12. *L. douglasii* krzyżują się, dając w pełni płodne potomstwo, 13. i 19. *L. arboreus*, 15. *L. hartwegi*, 21. *L. elegans*, i 16. *L. polyphyllus* krzyżują się łatwo, dając częściowo płodne  $F_1$  (od 6—75% żywotnych gamet), 14.  $F_1$  *L. arboreus*  $\times$  *L. hartwegi*, 17.  $F_1$  *L. polyphyllus*  $\times$  *L. arboreus*, 20.  $F_1$  *L. arboreus*  $\times$  *L. elegans*

botanicznych, że dla jednego i tego samego rodzaju jeden autor podaje 80 a drugi 300 a jeszcze inny 800 gatunków. Sytuacja ta zmusza do szukania metod, które by umożliwiły redukcję wielkiej liczby gatunków, a jednocześnie wskazały wynikiem jakiej krzyżówki jest określony osobnik. Do badań tego rodzaju nadają się szczególnie uproszczone metody chromatograficzne, nie chodzi przy tym nawet o chemiczną identyfikację występujących na chromatogramie związków, lecz tylko o charakterystyczny obraz chromatograficzny tak zwany „chemical finger print of a species”.

Wydaje się słuszne podanie najpospolitszej metody zastosowanej po raz pierwszy przez Alstona i Turnera, a następnie zaadaptowanej przez prawie wszystkich amerykańskich botaników zajmujących się chemotaksonomią.

### Metoda:

Rośliny suszy się w arkuszach przygotowawczych jak do zielnika, następnie pobiera się po kilka liści, które ekstrahuje się 5 ml 1% roztworu HCl w metanolu w ciemności przez 24 godz., następnie nanosi się eżąd około 100 kropel na arkusz



Ryc. 3. Chromatogramy dwukierunkowe pięciu odmian łubinu żółtego (*L. luteus*) i *L. Rothmalerii* (związki o charakterze fenoli). ++ — *L. luteus* — wzrost normalny, mutacje szybkiego wzrostu

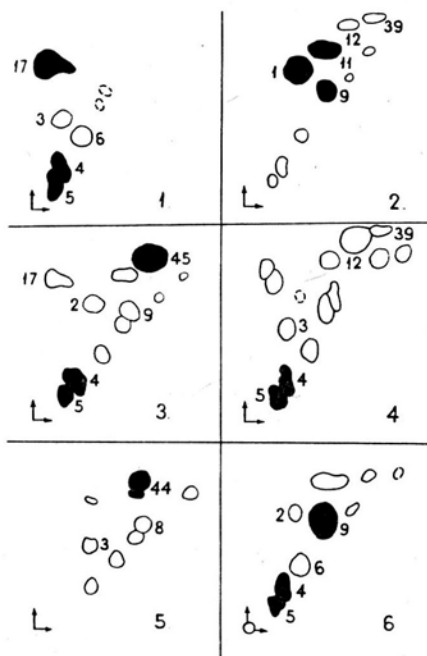
bibuły Whatmann 3MM i chromatografuje przez 24 godz. w rozpuszczalniku 1 i 4 godz. w kierunku prostopadłym do pierwszego w rozpuszczalniku 2.

Rozpuszczalnik 1. III-rzędowy butanol, kwas octowy, woda (3:1:1:v.v.v.)

2. kwas octowy, woda (15:85 v. v)

Każdy chromatogram po wysuszeniu umieszcza się w parach amoniaku i obserwuje w świetle dziennym i ultrafiolecie oraz w ultrafiolecie bez umieszczenia poprzednio w parach amoniaku. Wreszcie chromatogram spryskujemy dwuazowaną parani-troaniliną, zaznaczając plamy widoczne w różnych warunkach, otrzymujemy mapę chromatograficzną charakterystyczną dla danego gatunku. Większość widocznych

na chromatogramie substancji to różne pochodne aromatyczne. Poszczególne związki można wprowadzić odnaleźć w odległych jednostkach taksonomicznych, lecz mapa chromatograficzna jest czymś wybitnie specyficznym dla gatunku, a czasem nawet mniejszych jednostek (ryc. 1, 2, 3). W naszych badaniach stosowaliśmy metodę Alstona i Turnera po pewnych modyfikacjach do badań różnic gatunkowych i nawet odmianowych w łubinie. Stwierdziliśmy, że z powodzeniem można odróżnić gatunki, a przy szczegółowych analizach nawet odmiany należące do tego samego gatunku. Na ryc. 3 widać sześć chromatografów, z których pięć zrobiono

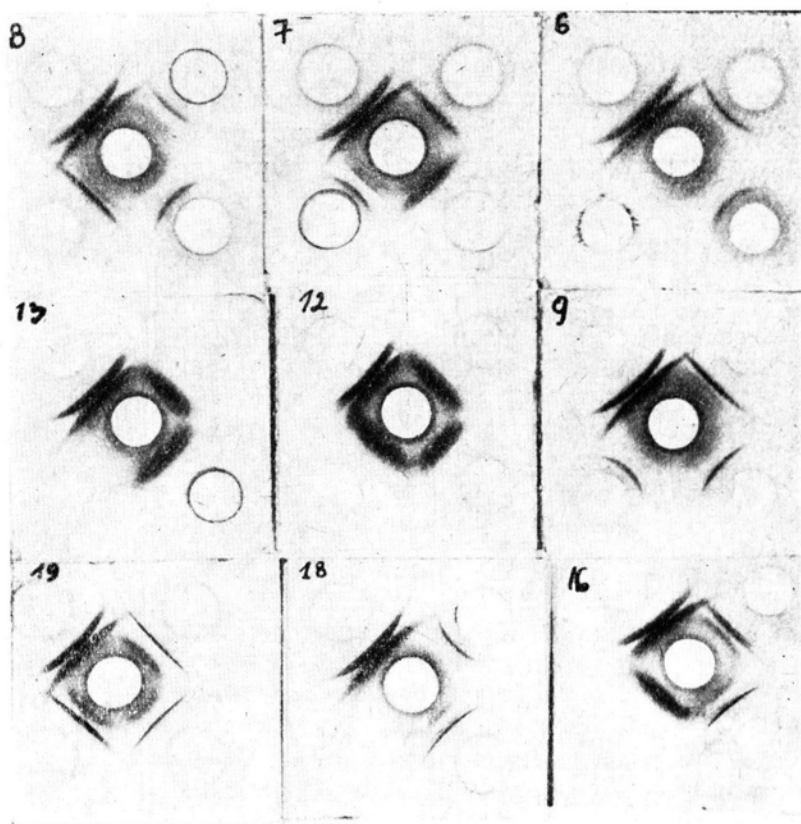


Ryc. 4. Chromatografia bibułowa aminokwasów z organów spichrzowych. Gałęzie (pędy): 1. *Cotoneaster*, 2. *Craya*, 3. *Robinia*, 4. korzeń spichrzowy: *Dicentra*, 5. Cebula: *Bowiea*, 6. korzeń: *Nymphaea*. Faza rozwijająca: propanol: woda (3:1), fenol: bufor boranowy pH 10 (nasycony); Bibuła: Schleicher i Schüll 204 3b. 1. cytrulina, 2. glutamina, 3. asparagina, 4. kwas glutaminowy, 5. kwas asparaginowy, 6. seryna, 9. alanina, 11. kwas  $\gamma$  amino-masłowy, 12. prolina, 17. arginina, 39. kwas 2-piperidyno-karboksylowy, 44. kwas 2-acetyldynokarboksylowy, 45.  $\delta$  acetyloornityna, wg Reutera (1957).

z młodych liści łubinu żółtego, a jeden z liści zbliżonego gatunku *Lupinus rothmalerii* Klink. gatunku, który do 1936 r. był uważany za odmianę botaniczną łubinu żółtego. Jak wykazały badania genetyczne T. Kazimierskiego *L. rothmalerii* jest odrębnym gatunkiem, gdyż wprowadzić można sporadycznie otrzymać mieszańce używając *L. rothmalerii* jako matki, ale rośliny mieszańcowe są praktycznie bezpłodne. Odmiany łubinu żółtego różniły się między sobą przede wszystkim rytmem wzrostu, która to różnica zaznaczała się od samego momentu kiełkowania (tablica 1).

Badania chemotaksonomiczne oparte o analizę „fenoli” są najpopularniejszą formą chemotaksonomii. Jeżeli weźmie się pod uwagę rodzaj związków stosowanych

Tablica 1



Przykłady immunodyszjogramów uzyskane za pomocą surowicy anty-*Lupinus albus* cv. Kali (Licząc zgodnie z ruchem wskazówek zegara od lewego górnego rogu. Układ gatunków na płytce): Płytkę nr 8: *L. albus*, cv. Kali, *L. elegans*, *L. latifolius*, Łubin mieszańcowy Bragdö; Płytkę nr 7: *L. albus* cv. Kali, *L. hartwegi* niebieski, *L. hartwegi* biały, *L. elegans*; Płytkę nr 6: *L. albus* cv. Kali, *L. polyphyllus*, Ł. mieszańcowy russel; Płytkę nr 13: *L. albus* cv. Kali, *L. pilosus* niebieski, *L. digitatus*; Płytkę nr 12: *L. albus* cv. Kali, *L. pilosus* niebieski, *L. pilosus* biały, *L. pilosus* różowy; Płytkę nr 9: *L. albus* cv. Kali, Ł. mieszańcowy Bragdö, *L. polyphyllus*, Ł. mieszańcowy russel; Płytkę nr 19: *L. angustifolius* cv. Wielkopolski gorzki, *L. angustifolius* var. *cryptantus* *L. angustifolius* var. *linifolius*; Płytkę nr 18: *L. albus* cv. Kali, *L. angustifolius* cv. Wielkopolski gorzki, *L. angustifolius* var. *cryptantus*; Płytkę nr 16: *L. albus* cv. Kali, *L. luteus* cv. Jantar, *L. hirsutus*, *L. pilosus*; wg W. Prus-Głowackiego.

w biochemicznej systematyce, to na drugim miejscu znajdują się alkaloidy. Te ostatnie są jednak o wiele mniej przydatne, po pierwsze dlatego, że nie występują we wszystkich gatunkach roślin, co więcej, są grupy gatunków pozbawione tych substancji, po drugie chromatografia alkaloidów jest trudniejsza, po trzecie prawie wszystkie alkaloidy dają z odpowiednimi odczynnikami plamy w jednym kolorze. Stąd też może się zdarzyć, że niespokrewnione gatunki będą miały wprawdzie różne alkaloidy, ale tak na chromatogramie rozmieszczone, że będzie to sugerowało ich identyczność. Wreszcie trzecia grupa związków to wolne aminokwasy; frakcja

ta jest dość zmienna i oprócz 20 aminokwasów, które występują w białku mogą się w niej znaleźć liczne nietypowe związki o charakterze aminokwasów, niektóre z nich mają niewątpliwie znaczenie taksonomiczne, np. kanawanina występuje w roślinach motylkowych, tingitanina wyłącznie w rodzaju *Lathyrus*. Ponieważ jednak reakcja aminokwasów z właściwym dla nich odczynnikiem to jest z ninhydryną prawie zawsze jest w kolorze niebieskofioletowym, do aminokwasów odnoszą się więc wszystkie zastrzeżenia jakie ważne są dla alkaloidów z tym jeszcze, że nieliczne dodatkowe aminokwasy gubią się na tle pospolitych w roślinach wolnych aminokwasach występujących normalnie w białku. Bez jakiegokolwiek znaczenia dla chemotaksonomi są natomiast aminokwasy z hydrolizatu białek. Wprawdzie przesadne jest twierdzenie, że nie można odróżnić chromatogram z hydrolizatu białek ziemniaka od takiegoż chromatogramu ze śledzia, ale niewątpliwie wszelkie wyceniane „na oko” różnice w zawartości białkowych aminokwasów w hydrolizatach z różnych roślin, są wyłącznie wynikiem fantazji. Otrzymane nawet przy pomocy czulej aparatury, jak np. kolektora frakcji, chromatografu gazowego itp. wyniki obarczone są od 30—100% błędem. Fiasko badań białek właściwych oparte o analizy składu aminokwasów w hydrolizacie nie jest równoznaczne z niemożliwością wykorzystania białek dla celów chemotaksonomicznych. Przy pomocy elektroforezy można bowiem otrzymać dość dobre obrazy niektórych grup białek i tak np. można odróżnić białka różnych gatunków łubinu, białka wyki od soczewicy, pszenicy od żyta itp., lecz w zasadzie na tym kończy się możliwość zastosowania tej metody do badań taksonomicznych; pewne usługi oddaje ona w genetyce stosowanej, gdy krzyżujemy odległe odmiany różniące się składem frakcji białek i gdy zależy nam na przeniesieniu jakiegoś zestawu białek z jednej formy do drugiej

## B. Metody immunologiczne

Zawartość i sekwencja aminokwasów w cząsteczce białka jest uzależniona od sekwencji zasad azotowych w cząsteczce kwasu dezoksyrybonukleinowego, a więc od tak zwanego kodu genetycznego. W zależności od rodzaju białka, aminokwasy układają się w określonej kolejności, co daje w efekcie tak zwaną pierwszorzędową strukturę białka, która w każdym organizmie różni się i może tym samym służyć jako kryterium oceny jednostek systematycznych.

Większość dotychczasowych prac nad białkami opiera się na badaniach ogólnej zawartości aminokwasów w hydrolizatach materiału roślinnego, i dalej określenie aminokwasów za pomocą różnych metod, między innymi chromatograficznie i za pomocą elektroforezy. Wydaje się, że bardziej istotnym zagadnieniem jest badanie całej frakcji białkowej, bez hydrolizowania jej na aminokwasy, które to hydrolizowanie nie pozwala na realną ocenę ilości i jakości frakcji białkowych, a jedynie na określenie globalnej ilości aminokwasów.

Pierwsze kroki w tym kierunku poczynione zostały w latach pięćdziesiątych, kiedy to do badań frakcji białkowych wprowadzono elektroforezę. Jest to, najprościej rzecz ujmując, metoda polegająca na tym, że określone grupy białek, frakcje, posiadają pewien ładunek, który pozwala im wędrować w polu elektrycznym w kierunku anody lub katody.



W Laboratorium Fitochemii próbowano rozdzielić białka łubinu i traw pastewnych za pomocą elektroforezy. Wyniki nasze dla łubinu w zasadzie pokrywały się z danymi uzyskanymi przez prof. Wiewiórowskiego i współpracowników, którzy badali białka zapasowe nasion łubinu żółtego, wąskolistnego i białego, otrzymali oni dla łubinu żółtego dwie frakcje białkowe, tak zwane konglutyny, dla wąskolistnego dwie i białego cztery. W 1958 r. J. Augustyniak badał elektroforetycznie białka krzyżujących się ze sobą gatunków łubinów amerykańskich i stwierdził, że posiadają one takie same frakcje białkowe. (Doniesienie ustne). Następne nasze badania poszły w kierunku rozdziału frakcji białkowych za pomocą immunodyszfuzji. W latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku w Instytucie Pasteura w Paryżu Miecznikow odkrył przy okazji badania szczepionek, że drobnoustroje chorobotwórcze, tego samego rodzaju, które zaatakowały organizm zwierzęcy, po wyzdrowieniu tego zwierzęcia wprowadzone do krwi są najpierw zlepiane (aglutynowane), a następnie pożerane przez białe ciała krwi. Zjawisko to nazwał fagocytozą. Istota rzeczy leży w tym, że każde obce gatunkowo białko wprowadzone do organizmu zwierzęcia nie *per os* powoduje powstanie specyficznych ciał białkowych zwanych przeciwciałami, przy czym każdej frakcji białkowej odpowiada swoiste przeciwciało.

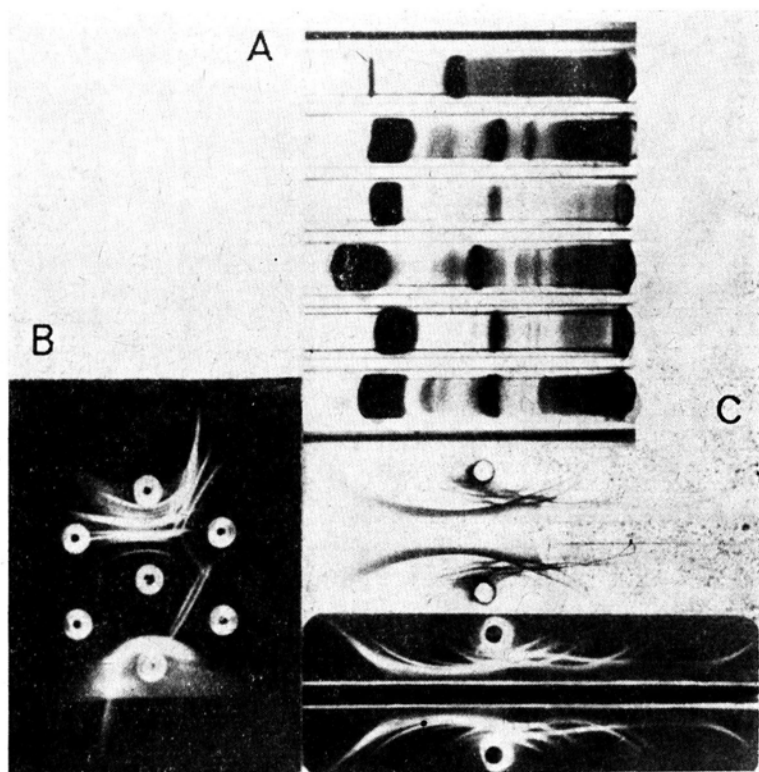
W 1920 r. Metz i Gohlke z Uniwersytetu w Królewcu wykorzystując to zjawisko rozpoczynają badania, zwane wtedy badaniami serologicznymi, chcąc zastosować immunologię do systematyki biochemicznej. Ówczesny stan wiedzy i prymitywne metody pozwoliły na rozróżnienie zaledwie wielkich jednostek systematycznych — bez rozróżnienia niejednokrotnie rodzajów. Badania te opierały się na określaniu stopnia zmętnienia surowicy krwi immunizowanego zwierzęcia, po dodaniu do tej samej surowicy białka badanych taksonów.

Metoda ta jako mało czuła odłożona została *ad acta*, aż do wynalezienia metody zwanej immunodyszfuzją. Próbowano rozdzielić frakcje białkowe trzech gatunków maków mianowicie: *Papaver rhoeas*, *P. dubium* i *P. argemone*. Metoda ta jako dość czuła rokowała pewne nadzieje i w 1965 r. na Sympozjum Genetycznym w Brnie kilku badaczy przedstawiło swoje prace z dziedziny immunodyszfuzji i immunoelektroforezy. Dotychczas tego typu badaniami zajmowali się Czechosłowacy, Rumuni, Niemcy, Japończycy i Amerykanie. W Polsce fitoaglutyninami zajmują się w Instytucie Terapii Doświadczalnej i Immunologii we Wrocławiu.

Metoda immunodyszfuzji polega na zastosowaniu jako medium reakcji precypitacyjnej żelu. Wykorzystano tutaj zjawisko różnej szybkości przenikania — dyfundowania przez środowisko żelowe cząsteczek białka frakcji z jednej strony i surowicy krwi immunizowanego zwierzęcia z zawartymi w niej przeciwciałami z drugiej. Na granicy zetknięcia się specyficznych dla siebie frakcji białkowych i przeciwciał następuje reakcja precypitacji — strącenia frakcji białkowych w postaci prążków, przy czym można powiedzieć, że każdy prążek odpowiada innej frakcji białkowej. Metoda ta ma pewną modyfikację zwaną immunoelektroforezą, która polega na zastosowaniu po immunodyszfuzji elektroforezy, tzn., że frakcje białkowe poruszają się dodatkowo w polu elektrycznym co pozwala na lepszy do pewnego stopnia ich rozdział.



Tablica 2

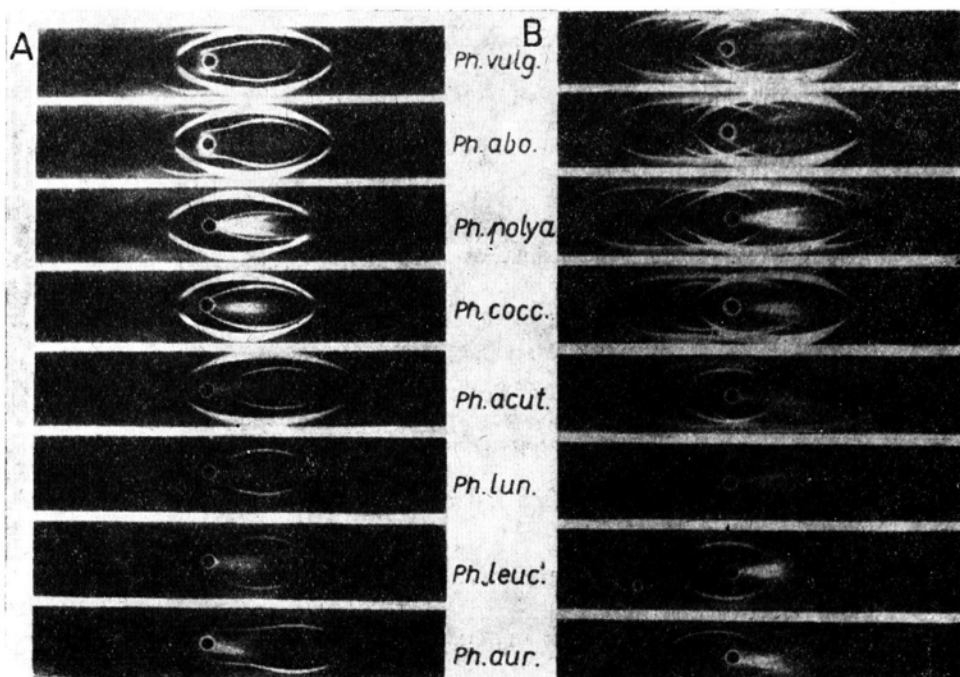


Jak powstała immunoelektroforeza: A. Elektroforeza białek na żelu, B. Immnodyfuzja, C. Immunoelektroforeza — kombinacje A i B.

W pracy naszej oparliśmy się na immunodyfuzji jako metodzie najprostszej i najtańszej. W części metodycznej wzorowano się na pracy Greala, Ericsona i Schulz-Schaeffera badaczy amerykańskich, którzy opracowywali pod względem biosystematycznym rodzaj *Agropyron*.

Białka roślinne łubinu białego odmiany „Kali” i trawy pastewnej *Festuca pratensis* izolowano z nasion przez wysolenie ich z drobno zmielonej mączki jednomolowym roztworem NaCl, po czym oczyszczano je wytrącając z roztworu siarczanem amonu, aż do wysycenia środowiska tą solą. Wytrącone białko osadzono na sączku i przeprowadzono na powrót w stan płynny za pomocą wody destylowanej. Tak przygotowane białko wstrzykiwano królikom rasy Belgijska biała, jednorazowo podając im około 200 mg białka w przypadku łubinu i około 70 mg w przypadku trawy co tydzień przez okres 4 tygodni. Po tym okresie sprawdzano czy zwierzęta wytworzyły przeciwciała. Surowicę uzyskiwano przez skrwawienie królika i odwirowanie upostaciowanych elementów krwi na wirówce laboratoryjnej stosując 2400 obrotów na minutę przez okres 20 minut. W ten sposób uzyskaną surowicę

Tablica 3



Z badań immunoelektroforetycznych Kłozka i Kłozowej. Białka różnych gatunków fasoli, wykryte przeciwciałami *Ph. vulgaris* cv. Veltruska Saxa. A. fazeoliny, B. wszystkie białka liścieni.

nakrapiano na specjalnie spreparowany agar 2 milimetrowej grubości. Białko roślinne do immunodyfuzji uzyskiwano w sposób analogiczny do opisanego przy uzyskiwaniu białka do iniekcji. Płytki z agarem trzymano w temp. pokojowej. Po trzech dniach od momentu nakropienia surowicy i badanych białek zaczynają się pojawiać prążki precypitacyjne, przy czym rozdział frakcji białkowych jest najlepszy i najwyraźniejszy na siódmy dzień od momentu rozpoczęcia eksperymentu.

Badania immunoelektroforetyczne prowadzono wg metod opisanych przez Grabara i Scheideggera. Do elektroforezy białek traw stosowano bufor octanowo-weronalowy 0,143 M o  $\text{pH} = 6,75$  i sile jonowej 0,05 do białek łubinów bufor -weronalowo-medinalowy o  $\text{pH} = 8,6$ . Czas trwania elektroforezy wynosił przy metodzie mikro-Scheideggera 2 godziny i przy metodzie makro-Grabara 2,5 godz. Elektroforezę prowadzono stosując prąd o natężeniu 26—30 m A. W naszym laboratorium przeprowadzono badania na rodzajach *Lupinus* *Lolium* i *Festuca*. Badania nad łubinami pozwalają na skonfrontowanie wyników badań chemotaksonomicznych opartych na swoistym zestawie alkaloidów z badaniami immunodyfuzyjnymi. Zasadnicze frakcje białkowe otrzymane na agarze są identyczne w obrębie sekcji botanicznej, natomiast pojawiają się prążki dodatkowe — specyficzne dla gatunków, a nawet pozwalają na rozróżnienie — odmian botanicznych i tak np. występują różnice we frakcjach białkowych między łubinami wąskolistnymi odmiany

*Cryptantus* i Wielkopolski gorzki, oraz białym odmiana Kali i TK. W przypadku dwóch odmian amerykańskiego łubinu, ozdobnego *L. hartwegi*; białej i niebieskiej pewne wspólne z *L. elegans* prążki na immunogramach potwierdzają nasze przypuszczenie oparte o badania genetyczne i chemiczne, że niebiesko kwitnący *L. hartwegi* w trakcie uprawy w ogrodach botanicznych uległ introgresywnemu krzyżowaniu z *L. elegans*.

Zalety metody immunodifyzycznej są duże w stosunku do elektroforezy. Elektroforeza przy założeniu, że mamy jeden aparat pozwala na wykonanie 6 analiz dziennie, przy czym w tej chwili rozdział elektroforetyczny frakcji białek roślinnych nie jest zadowalający i napotyka na wiele trudności. Przy immunodifyzji według pobieżnych obliczeń można dziennie wykonać około 40 analiz, przy bardzo nikłym zużyciu materiału co na pewno mogłoby znaleźć zastosowanie przy selekcji masowej pojedynków na mutacje korzystne jak i niekorzystne dotyczące zmiany frakcji białek w organizmie roślinnym. Wydaje się, że metodą tą można by określać również zmiany frakcji białkowych pod względem ilościowym i jakościowym w roślinach pastewnych, np. trawach pod wpływem wysokiego nawożenia azotowego, które to zagadnienie nabiera w ostatnim czasie w związku ze stosowaniem dużych dawek azotowych ogromnej wagi.

Nasza metoda przedstawiona powyżej niewiele odbiega od metod stosowanych w innych pracowniach. Prace nad tym zagadnieniem są obecnie coraz szerzej prowadzone. Z już opublikowanych prac wynika, że otrzymano wiele rezultatów potwierdzających wcześniejsze badania taksonomiczne oparte bądź to o cechy morfologiczne bądź też chemiczne.

Metody immunologiczne są niezwykle proste lecz fakt, że do stosowania ich potrzebne są zwierzęta może zniechęcać niektórych botaników, niemniej wypada zaznaczyć, że do zrobienia jednej dobrze zaplanowanej pracy wystarczyć może kilka królików, a w niektórych sytuacjach nawet tylko jeden.

Jako przykład wyników otrzymanych metodami immunologicznymi podajemy immunogramy z naszych prac nad rodzajem *Lupinus* załączamy również immunoelektroforogramy z prac Kłozy i Kłozowej.

Metoda immunologiczna i jej udoskonalenie a mianowicie immunodifyzja mogą stać się w ręku botanika precyzyjnym instrumentem umożliwiającym identyfikację wszelkich, nawet mniejszych od gatunku jednostek taksonomicznych.

W załączeniu podajemy nieco szerszą niż cytowaną literaturę, aby zorientować czytelnika w możliwości zastosowania metod chemicznych i immunologicznych.

#### LITERATURA

- Alston R. E., Turner B. L., 1962. *New techniques in analysis of complex natural hybridization*. National Academy of Science **48**, 136—137.
- Alston R. E., Simmons., 1962. *A specific and predictable biochemical anomaly in interspecific hybrids of *Baptisia viridis* × *B. Leucantha**, Nature **195**, 825.

- Alston R. E., Turner B. L., Lester R. N., Horne D., 1962. *Chromatographic validation of two morphologically similar hybrids of different origins*. Since **137**, 1048—1050.
- Alston R. E., Hagen W., J. R. 1957. *Chemical aspects of the inheritance of flower colour in *Impatiens balsamina* L.* Genetics, **43**, 35—47.
- Bailey E., Bailey L., 1965. *Phylogenetic studies on the genus *Ptelea* (Rutaceae), Chromatography as an aid to classification of taxonomic relationship between varieties of *Ptelea trifoliata* Subsp. *angustifolia* and subsp. *pallida**. Lloydia, **28**, 27—43.
- Bell A., 1962.  *$\alpha$   $\gamma$  diaminobutyric acid in Seed of twelve species of *Lathyrus* and identification of a new natural amino acid, L-homoarginine, in seeds of other species toxic to man and domestic animals.*, Nature, **193**, 1078—1079.
- Bell E. A., 1962. *Associations of ninhydrinreacting compounds in the seeds of 49 species of *Lathyrus**. Biochem. J. **83**, 225.
- Birdsong B. A., Alston R., and Turner B. L., 1960. *Distribution of canavarine in the family leguminosae as related to phyletic groupings*. Can. J. Botany, **38**, 499—505.
- Böhm H., 1965. *Über *Papaver bracteatum* Lindl. II. Mitteilung: Die Alkaloide des reifen Bastards aus der resiproken Kreuzung dieser Art mit *Papaver somniferum* L.* Planta Medica, **2**, 234—240.
- Böhme H., Schütte H. R., 1956. *Genetisch — biochemische Untersuchungen über Blütenfarbstoffe an Mutanten von *Antirrhinum majus* (L)* Biol. Zentralblatt, **9/10**, 597—611.
- Clauss F., 1963. *Über physiologische Ursachen der Ascochyta und Mycospho-erella — Resistenz der Erbse (*Pisum sativum* L.)*, Der Züchter, **8**, 323—337.
- Cranmer M. F., Turner B. L., 1967, Evolution, **21**, 508.
- Fangeras G., Paris R., 1965. *Chimiotaxonomie des Papilionacees Genistees*. Bull. de la société Botanique de France. 75—102.
- Fikenscher H., Hegnauer R., 1963. *Chemotaxonomische untersuchungen bei *Dryopteris* — Arten. V. Mitteilung: Ergänzung der Analysenmethode und Untersuchungen bei *Dryopteris cristata* (L.) A. Gray and *Dryopteris Villani* (Bell) Woynar.*, Planta Medica **3**, 348—354.
- Fikenscher H., Hegnauer R., 1963. *Chemotaxonomische Untersuchungen mit *Dryopteris* — Arten. Phloroglucide der Sammelart *Dryopteris filix-mas**. Planta Medica **3**, 354—361.
- Fikenscher L. H., 1960. *Het voorkomen van nicotine in het genus *Acacia**. Pharm. Weekblad, **95**, 233—235.
- Gill St. Steinegger E., 1964. Pharm. Acta Helvet., **39**, 508, *Phytochemische Untersuchungen in der Gattung *Cytisus* L.*
- Gill St., Steinegger E., 1964. *Alkaloid vorkommen in *Genista* — Arten*, Pharm. Acta Helvet., **39**, 565.
- Heiser Ch. B. Jr., Smith M., 1960. *The origin of *Heliantus multiflorus**. Am. J. of Botany, **47**, 860—865.
- Hegnauer R., 1959. *Die Verbreitung der Blausäure bei den Cormophyten.*, 2. Mitteilung: *die Cyanogenese in Genus *Taxus**. Pharm. Weekblad, **94**, 241—248.
- Hegnauer R., 1959. *Chemotaxonomische Betrachtungen. 9. Die Systematische Bedautung des Antrachinon — Merkmals*, Planta Medica **4**, 344—366.
- Hegnauer R., 1958. V. *Die Systematische bedeutung des Alkaloidmerkmals*. Planta Medica, **1**, 1—34.
- Hegnauer R., 1958. *Chemotaxonomische Betrachtungen, VI. Phytochemie und Systematik: Eine Rück — und Vorausschau auf die Entwicklung einer Chemotaxonomie*. Pharm. Acta Helvetiae, **33**, 287—305.
- Hegnauer R., 1958. *Over de verspreingind van blauwzuur bij vaatplantan*. Pharm. Weekblad, **93**, 801—819.
- Hegnauer R., 1965. *Loydia Chemotaxonomy — Past and Present*, **28**, 267.
- Kazimierski T., Nowacki E., 1961. *Perenial lupin*. Genetica Polonica, **2**, 75—79.
- Morris Kupchan S., Zimmerman J. H., Afonso A., *The alkaloids and taxonomy of *Veratrum* and Related Genera*, 1961, Lloydia, **24**, 1—25.
- Liss I., 1961. *Vorkommen und Bildung von 3,4 Dioxypyphenylalanin in den Geweben und im Latex von *Euphorbia lathyris* L.*, Flora, **151**, 351—367.
- Lorenz H., Schulz-Schaeffer J., 1964. *Biosystematic investigations in the Genus *Agropyron* Gaertn. T. A. chromatografial Approach*. Zeitschrift für Pflanzenzüchtung., **52**, 13—26.
- Mirov N. T., 1963. *Chemistry and plant taxonomy*. Lloydia, **26**, 117—124.
- Nowacki E., 1959. *Możliwość zastosowania w filogenetycznej systematyce wiadomości o rozpowszechnieniu i biogenezie alkaloidów typu łubinowego*. Wiadomości Botaniczne, III, 51—54.

- Nowacki E., 1960. *Fitogenetyczne i taksonomiczne znaczenie niektórych właściwości metabolizmu roślin motylkowych*. Wiadomości Botaniczne IV, 295—299.
- Nowacki E., 1961. *An interspecific hybrid: Lupinus mutabilis*, Sweet. X *L. ornatus* Dougl. X *L. douglasii* Lindl. Genetica Polonica, 2, 1—17.
- Nowacki E., 1961. *Cechy biochemiczne a kryterium gatunku*, Wiadomości Botaniczne, V, 191—196.
- Nowacki E., Bragdø M., Duda A., Kazimierski T., 1961. *Genetische Methoden zur Untersuchungen des Alkaloid — Stoffwechsels in Lupinen*. Flora, 151, 120—125.
- Nowacki E., 1964. *Differences in chemical composition of yellow Lupin forms with a different growth rate*, Genetica Polonica, 5, 123—124.
- Nowacki E., Dunn D. B., 1964. *Shrubby California lupines and relationship suggested by alkaloid content*. Genetica Polonica, 5, 47—56.
- Nowacki E., Nowacka D., 1965. *Biogenetyczna klasyfikacja alkaloidów*, Wiadomości Botaniczne, IX 207—216.
- Nowacki E., Nowacka D., 1966. *Über die Mitwirkung des alkaloidarmessprosses bei der Ausbildung des Alkaloidspektrums in Lupinen. Metabolische Ähnlichkeit nach Pfropfung und Kreuzung*, Flora, 156, 457—463.
- Nowacki E., 1966. *Dziedziczenie cech biochemicznych*, Postępy Nauk Roln., 2, 17—34.
- Piechowski M., 1962. *Taksonomia molekularna bakterii a podstawowe problemy biologii, I. Zależenia genetyczno-molekularne*. Wiadomości Botaniczne, IV, 3—23.
- Piechowski M. 1962. *Taksonomia molekularna bakterii a podstawowe problemy biologii. II. Mechanizm przekazu informacji*. Wiadomości Botaniczne, VI, 161—174.
- Reinert R. A., Hildebrandt A. C., Beck G., 1963. *Differentiation of Viruses Transmitted from Pelargonium hortorum*, Phytopathology, 53, 1292—1298.
- Reuter G., 1957. *Die Hauptformen des löslichen Stickstoffs in vegetativen pflanzlichen Speicherorganen und ihre systematische Bewertbarkeit*, Flora, 145, 326—338.
- Riley H. P., Bryant T. R., 1961. *The Separation of nine species of the Iridaceae by paper chromatography*. Am. Journal of Botany, 48, 133—137.
- Riley H. P., Isbell C. J., 1963. *Paper chromatographie studies in the Aloineae*.  
1. *Preliminary observations on some species of Haworthia*. Jour. of South African Bot. XXIX, 59—73.
- Romeike A., 1956. *Über die Mitwirkung die Sprosses bei der Ausdildung des Alkaloidspektrums. Epoxyd-bildung beim Hyoscyamin durch Datura ferox*, L. Flora, 143, 67—86.
- Romeike A., 1962. *Weitere Versuche zur Züchtung einer scopolaminreichen. Datura — Hybride.*, Die Kulturpflanze, X, 140—148.
- Ruijgrok H. W. L., 1963. *Chemotaxonomische Untersuchungen bei den Ranunculaceae*.  
II. *Über Ranunculin und verwandte Stoffe*. Planta Medica, 3, 338—347.
- Sandberg F., 1961. *Phytochemical and pharmacological studies on some alkaloidal plants of Egypt*. International Symposium on Plant Resources, 4, 280—293.
- Schütte H. R., Lagenbeck W., Böhme H., 1957. *Genetisch — biochemische Untersuchungen über Blütenfarbstoffe on Mutanten von Antirrhinum majus (L.) Chinasäure als p. Cumarsäureester in Antirrhinum majus*. Naturwissenschaften, 3, 63.
- Schütte H. R., Hindorf H., 1964. *Über Vorkommen und Biosynthese von Spartein in Chelidonium majus*. 19, 463.
- Sulinowski S., 1967. *Interspecific and intergeneric hybrids in grasses of the Festuca und Lolium Genera*, Genetica Polonica, 8, 17—30.
- Schwarze, Hackbarth J., 1957. *Untersuchungen über die Alkaloidkomplexe von gelben, blauen und weissen Lupinen „Der Züchter“*, 27, 332—341.
- Schreiber K., 1957. *Natürliche pflanzliche Resistanzstoffe gegen den Kartoffelkäfer und ihr möglicher Wirkungsmechanismus.*, Flora, 289—299.
- Smith M., 1960. *The chromosome number of Helianthus decapetalus*, Kentucky Academy of Science, 21, 17—19.
- Smith D. M., Bryant T. R., Tata D. E., 1961. *New evidence on the hybrid nature of Asplenium Kentuckiense*, Brittonia, 13, 289—292.

- Smith H. H., Abashian D. V., 1963. *Chromatographie investigations on the alkaloid content of Nicotiana species and interspecific combinations*. Am. J. of Botany **50**, 135—147.
- Smith D. M., Levin D. A., 1963. *A chromatographic study of reticulate evolution in the Appalachian Asplenium complex*. Am. J. of Botany, **50**, 952—958.
- Smith D. M., Bryant T. R., Tate D. E., 1961. *Asplenium*  $\times$  *Gravesii* in Kentucky. Brittonia, **13**, 69—72.
- Spellman D. L., Dunn D. B., 1965. *Schmaltzia serotina* as a part of *Rhus tribolata*. Brittonia, **17**, 286—288.
- Stebbins G. L., Harvey B. L., Cox E. L., Rutger J. N., Jelenovic G., Yagil E., 1963. *Identification of the ancestry of an amphiploid Viola with the aid of paper chromatography*, Am. Journal of Bot., **50**, 830—839.
- Stermitz F. R., 1968. *Alkaloid chemistry and the systematics of Papaver and Argemone*. Recent Advances in Phytochemistry, **1**, 161.
- Tschierch B., 1959. *Über Canavanin*, Flora, **147**, 405—416.
- Tschierch B., 1961. *Über das Vorkommen von Canavanin*, Flora **150**, 87—94.
- Turner B. L., Alston R., 1959. *Segregation and recombination of chemical constituents in a Hybrid swarm of Baptisia leavicaulis  $\times$  B. viridis and their taxonomic implications*. Am. J. of Bot., **46**, 678—686.
- Tetenyi P., Vagujfalvi D., 1968. *Plantes Medic. et Phytotherapie*, **2**, 97, Importance, Taxinomique des Alcaloides du Pavot.
- Tschierch B., Hanelt P., 1967. *Die Freien Aminosäuren der Samen von Vicia und die Systematische Gliederung der Gattung*, Flora, **157**, 389.
- White E. P., 1951. *Alkaloids of the Leguminosae Part XVIII — The structure of calyotomine New Zealand*. J. of Science and Technology, **33**, 38—60.
- White E. P., 1954. *Alkaloids of the Leguminosae Part XXIII — The occurrence of n-methyl-phenylethylamine in Acacia prominens*, A. Cunn. New Zealand J. of Science and Technology, **35**, 451—454.
- Wiewiórowski M., Bratek M. D., 1956. *Die qualitative Zusammensetzung der Lupinenalkaloide im Lichte chromatographischer Untersuchungen*. Abhandlungen der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, **7**, 79—87.
- Yap F., Reichardt A., 1964. *Vergleichende Untersuchungen der Flavonide und Oxyzimtsäuren in den Blättern artreiner Vitis — Sorten und ihrer Bastarde*. „Der Züchter“, **34**, 143—156.

#### LITERATURA — IMMUNOLOGIA

- Buzila L., 1967. *Physico-chemical and immunochemical correspondences between the cryoprotein and vicilin of pea-seeds (Pisum sativum)*, Rev. roum. Biochim., **4**, 2, 103—108.
- Catsimpoilas N., Campbell T. G., Meyer E. W., 1968. *Immunochemical study of changes in reserve proteins of germinating soybean seeds*, Plant Physiology, **43**, 5, 799—805.
- Daussant J., 1966. *Etude des proteines solubles de l'orge et du malt par des methodes immunochimiques*, Scien. L'Univer. Paris.
- Fairbrothers D. E., Johnson M. A., 1961. *The precipitin reaction as an indicator of relationship in some grasses*. Physiology, **2**, 116—120.
- Fairbrothers D. E., 1966. *The comparison and interpretation of serological data in plant systematics*, Proc. Sym. Mutational Process, 458—464.
- Fairbrothers D. E., *Comparative serological studies in plant systematics*, Serological Mus., **35**, 2—7.
- Ghetie V., 1966. *Evolution of protein characters in ontogenesis of higher plants*, Proc. Sym. Mutational Process, 489—503.
- Grabar P., 1968. *New aspects of immunoelectrophoretic analysis*. 6th int. Congr. clin. Chem. Munich, **1**, 91—92.
- Grabar P., Avrameas S., Taudon B., Salomon J. C., *Formation and isolation of antibodies specific for nucleotides*, Nucleic acids in immunology.
- Grabar P., Escibano M. J., Benhamou N., Daussant J., 1965. *Immunochemical study of Wheat, barley, and malt proteins*, J. Agri. Food Che. **13**, 5, 392—398.
- Hall O., 1959. *Immuno-electrophoretic analyses of allopolyploid ryewheat and its parental species*, Hereditas **45**, 495—504.



- Hillebrand G. R., Fairbrothers D. E., 1970. *Phytoserological systematic survey of the Caprifoliaceae*, Brittonia, **22**, 2, 125—133.
- Jensen U., 1965. *Serologische Untersuchungen zur Frage der systematischen Einordnung der Didiereaceae*, Bot. Jb. **84**, 3, 233—253.
- Jensen U., 1967. *Serologische Beiträge zur Frage der Verwandtschaft zwischen Ranunculaceen und Papaveraceen*, Berich. Deutsch. Bot. Gesellschaft, **80**, 9, 621—624.
- Johansson H., Hillebrand, 1969. *A serologic and electroforetic comparison of proteins in crude saline seed extracts of the Triticeae and Agrostaeae*, Hereditas, **63**, 15, 429—434.
- Kubo K., 1964. *An empirical equation for the precipitin reaction system and its application to systematic serology*, Serological Mus., **31**, 1—8.
- Klozova E., Kloz J., 1966. *Protein characters in species hybrids of the genus Phaseolus studied by means of serological methods*, Acta Agr. Scand., **16**, 225—228.
- Klozova E., 1966. *Interrelations among several asiatic species of the genus Phaseolus studied by immunochemical methods*, Proc. Sym. Mutational Process, 485—487.
- Kloz J., Klozova E., Turkova V., 1966. *Protein characters and relationship between Phaseolus vulgaris Sp. aborigineus Burk. and related taxons of the genus Phaseolus*, Biol. Plantarum, **8**, 3, 187—196.
- Merz W. G., Burell R. G., Gallegly N. E., 1969. *A serological comparison of six heterothallic species of Phytophthora*, Phytopathology, **59**, 3, 367—370.
- Moritz O., Jensen U., 1961. *An attempt at a formular description of procedures and results in comparative serology*.
- Moritz O., 1965. *Über die homologe Restreaktivität von Immunopräzipitaten aus heterologen reaktionen und ihre Bedeutung*, Acta Biocatalytica, XXIX, 155—168.
- Nasrallah M. E., Wallace D. H., 1967. *Immunogenetics of selfincompatibility in Brassica oleracea L.*, Heredity, **22**, 4, 519—527.
- Prus-Głowacki W., Sulinowski S., Nowacki E., 1969. *Skład białek na podstawie analiz immunologicznych w krzyżujących się gatunkach i rodzajach traw*, Symp. Krzyż. Międzygatunkowych i międzyrodzajowych. Genetica Polonica — w druku.
- Prus-Głowacki W., 1970. *Możliwość zastosowania metod immunologicznych w hodowli Roślin*, Biul. Branż. Hod. Roślin i Nasiennictwa — 5(26) 9—18.
- Prus-Głowacki W., Sulinowski S., Nowacki E., 1971. *Immuno-Electrophoretic Studies of Lolio-Festuca Allopolyploid and its Parental Species*, Biochem. Physiol. Pflanzen **162**, 417—426.
- Tucker W. G., 1969. *Serotaxonomy of the solanaceae. A preliminary survey*, Ann. Bot., **33**, 129, 1—23.