Oksydazy końcowe tkanek roślinnych hodowanych in vitro Cz. I. Działanie inhibitorów oddechowych. Oksydazy miedziowe

Terminal oxidases in plant tissues cultivated in vitro.

I. The effect of respiratory inhibitors. Copper oxidases.

JADWIGA MICHEJDA

WSTĘP

W ostatnich latach prowadzone były liczne badania nad mechanizmem oddychania roślin wyższych. Obszerna literatura dotycząca tego problemu została zebrana w szeregu opracowań referatowych (James 1953, 1954, 1957, Hartree 1957, Smith, Chance 1958, Hackett 1959).

Wiemy dzisiaj, że najbardziej rozpowszechnionym u roślin wyższych systemem czynnym w transporcie elektronów między dehydrogenazami i tlenem atmosferycznym jest system cytochromowy, który w każdym razie jest decydującym dla wzrostu (Hackett, Schneiderman 1953, Eichenberger, Thimann 1957), dla pobierania wody (Hackett, Schneiderman, Thimann 1953) oraz pobierania i akumulacji soli mineralnych przez korzenie i tkanki roślinne (Lundegårdh 1954). System cytochromowy jest obecnie znajdowany w tych obiektach roślinnych, w których dotychczas były trudności z jego wykryciem w związku z koniecznością utrzymania odpowiedniego pH w czasie preparowania tkanki (Lieberman 1958) lub koniecznością zastosowania specjalnie udoskonalonej techniki badań (James, Lundegårdh 1959).

Badania nad lokalizacją enzymów oddechowych w obrębie komórki roślinnej doprowadziły do wniosku, że — podobnie jak w komórkach zwierzęcych — reakcje utlenienia i fosforylacji związane z cyklem kwasów trójkarboksylowych są zlokalizowane w mitochondriach (Millerd, Bonner 1953, Goodard, Stafford 1954, Hackett 1955). Ma to miejsce zarówno w tkankach bezzieleniowych, jak i zawierających chloroplasty, co zostało stwierdzone w szeregu nowszych prac (Smillie, 1955, 1956, Sisakjan, Bekina, Mosolova 1957, James, Das 1957, Pierpoint 1959).

Co do roli oksydaz miedziowych w metabolizmie oddechowym tkanek roślinnych zdania są podzielone. Większość wyników skłania jednak do wniosku, że o ile oksydaza kwasu askorbinowego może w pewnych warunkach działać jako oksydaza końcowa (M apson, 1958), to rola oksydazy wielofenolowej ogranicza się raczej do oksydoredukcji beztlenowych (Bonner 1957, James 1957).

Liczne prace wskazują na zmienność i adaptacyjny charakter enzymów oddechowych u roślin wyższych. Wykazano zależność aktywności poszczególnych enzymów oraz przesunięcia równowagi między układami enzymatycznymi pod wpływem szeregu czynników, takich jak wiek rośliny lub organu (Fortini 1956, Howard, Yamaguchi 1957, 1957a, Rubin 1955), światło (Rubin, Černavina, Micheeva 1955, Weinstein, Robbins 1955) długość dnia (Čajlachjan, Bojarkin 1955), wartość osmotyczna tkanki (Laties 1954, Thimann, Yocum, Hackett 1954), pierwiastki śladowe (Brown, Steinberg 1953) i infekcje wirusowe (Vager 1955). Wobec olbrzymiej ilości prac dotyczących enzymów oddechowych w różnych organach różnych gatunków roślin, stosunkowo niewiele poświęcono uwagi tym enzymom w tkankach roślinnych hodowanych *in vitro*. Dotychczasowe badania obejmowały głównie katalazę i peroksydazę (Czosnowski 1952, Camus, Lence 1955, Morel, Demetriades 1955) oraz oksydazę wielofenolową (Morel, Demetriades 1955, Loo, Lie 1957). Wyjątkowo badane były inne enzymy, zwłaszcza układu cytochromowego (Gentile, Naylor 1955).

Ponieważ wydaje się, że tkanki roślinne hodowane *in vitro* mogłyby stanowić dobry materiał do badań nad enzymami oddechowymi, zwłaszcza nad ich zdolnościami adaptacyjnymi, podjęto badania nad kilkoma z nich. Celem tych badań było przede wszystkim stwierdzenie obecności enzymów mogących grać rolę oksydaz końcowych i udziału ich w oddychaniu tkanek.

W pierwszej części pracy zajęto się pomiarami zapotrzebowania tlenowego skrawków czterech tkanek hodowanych *in vitro*, ich współczynników oddechowych, wpływem inhibitorów oddechowych na zapotrzebowanie tlenowe oraz wykryciem ewentualnych oksydaz miedziowych w homogenatach całkowitych tkanek i pewnych ich frakcjach.

Skróty stosowane w pracy:

Dc	— tkanka <i>Daucus carota</i>
Pt	— tkanka <i>Parthenocissus tricuspidata</i>
Sh	— tkanka <i>Scorzonera hispanica</i>
Om	— tkanka <i>Opuntia monacantha</i>
DDC	— dwuetylodwutiokarbaminian sodu
EDTA	— kwas etylenodwuaminocteroowy

AA	— kwas askorbinowy
AA-ox	— oksydaza kwasu askorbinowego
RQ	— współczynnik oddechowy
QO ₂	— $\mu\text{l O}_2/\text{g św. masy tkanki/godz.}$

MATERIAŁ I METODY

T k a n k i.

Do doświadczeń użyto czterech następujących tkanek roślinnych hodowanych *in vitro* (Gautheret 1954):

Gatunek	Typ tkanki
<i>Daucus carota</i>	anergizowana*
<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	„
<i>Scorzonera hispanica</i>	Crown-Gall
<i>Opuntia monacantha</i>	„ „

Tkanki hodowano w temp. 24°C na stałym świetle sztucznym (lampy jarzeniowe, intensywność oświetlenia — 600 lux), w probówkach 23×120 mm, zawierających po 12,5 ml pożywki. Wszystkie wymienione tkanki hodowane były na pożywce o następującym składzie: pożywka mineralna wg Hellera (1952), sacharoza 2‰, agar. 0,6‰. Doświadczenia przeprowadzano w miesiącach: od kwietnia do czerwca na tkankach liczących 6—7 tygodni od przeszczepienia.

Pomiary oddychania.

Wyjęte z probówki hodowlanej tkanki oczyszczano z agaru oraz odcinano część dolną, często zawierającą części znekrozowane. Tkanki cięto na skrawki grubości 0,5 mm, po czym odważano porcje 0,7 g lub 0,2 g i każdą umieszczano w 10 ml 1/15 M buforu fosforanowego o pH 6 lub 7, mieszając co pewien czas. Po upływie 2 godzin skrawki odsączano na bibule filtracyjnej i przenoszono do naczynek Warburga zawierających ten sam bufor, jaki był użyty do płukania skrawków. Spośród badanych tkanek *Pt* była specjalnie trudnym obiektem do pokrajania na skrawki z uwagi na bardzo luźną strukturę tkanki i z tego powodu kontrola nad grubością skrawków była utrudniona.

Oddychanie skrawków oraz inhibicję tego oddychania mierzono metodą manometryczną, w naczynkach Warburga o całkowitej pojemności 15—20 ml. Wyjątkowo, z uwagi na małą ilość materiału (*Pt*) stosowano naczynka o pojemności 7 ml. Objętość fazy płynnej wynosiła odpowied-

* Tissus anergis (Gautheret 1959).

nio 2,5 oraz 0,8 ml. Do naczynek dawano 0,7 lub 0,2 g skrawków. Studzienki zawierały 0,1—0,2 ml KOH 1 N. Pomiarów dokonywano w temperaturze 25°C, wyrównanie termiczne wynosiło 15 minut, oscylacja 110/minutę, amplituda wychyleń 50 mm. Odczyty manometryczne dokonywano co 20 minut przez 2 godziny. Oddychanie przebiegało liniowo przez przynajmniej 3 godziny. Aby uniezależnić się od indywidualnych różnic w oddychaniu poszczególnych tkanek, pomiarów inhibicji oddychania dokonywano w tych samych naczynkach, w których uprzednio badano zużycie tlenu bez dodatku inhibitora, dodając przewężoną mikropipetką 10—100 μ l odpowiednio stężonego roztworu inhibitora. Przy stosowaniu KCN zawartość studzienki wymieniano na odpowiednią mieszaninę KOH i KCN wg proporcji podanych przez K r e b s a (1935). Współczynniki oddechowe mierzono metodą różnicową, mierząc spadek ciśnienia w naczynku Warburga najpierw bez dodatku ługu, a następnie po 1,5 godz. pomiarów dodając ług do studzienki.

Homogenaty tkanek.

Świeżo wyjęte z probówek hodowlanych i oczyszczone z agaru tkanki odważano (2—4 g) i rozcierano w przechłodzonym porcelanowym moździerzu z dodatkiem podwójnej ilości przechłodzonego buforu fosforanowego 0,18 M o pH 6,5 (dla oznaczania AA-ox) lub pH 7,0 (dla oznaczania fenolaz). pH homogenatów wynosiło odpowiednio 6,3 i 6,6. Po wstępnym roztarciu w moździerzu miążgę tkanki przenoszono do homogenizatora teflonowego i homogenizowano przez 30 sek. przy 1000 obr./min, w łaźni o temp. 0°C.

Preparowanie frakcji cząstkowych tkanek

Przy preparowaniu frakcji cząstkowych wszystkich wymienionych tkanek używano trzech roztworów:

- Roztwór A — 0,4 M sacharoza,
0,002 M EDTA,
0,1 M bufor fosforanowy wg Sörensena pH 7,0,
- Roztwór B — 0,4 M sacharoza,
0,01 M bufor fosforanowy pH 7,0,
- Roztwór C — 0,2 M sacharoza,
0,005 M bufor fosforanowy pH 7,0.

Roztwór A jest około dwukrotnie hipertoniczny w stosunku do tkanek, których wartość osmotyczna mierzona metodą mikro-kryoskopową wynosiła średnio: $\Delta t = 0,5^\circ$ (0,27 osmM). Roztwór C jest nieco hipotoniczny w stosunku do tkanek. EDTA dodawano ze względu na jego stabilizujący i aktywujący wpływ na systemy oksydazowe izolowanych mitochondrii roślinnych (Lieberman, Biale 1955). 6—7 g tkanki rozcierano w przemrożonym mózdzierzu z 14 ml przechłodzonego płynu A. Otrzymaną masę sączo przez muślin i przesącz wirowano przez 8 minut przy 1000 x g używając wirówki Servall SS-1 umieszczonej w zamrażarce w temp. 0—2°C. Supernatant wirowano przez 15 min. przy 11500 x g. Uzyskany osad resuspendowano w homogenizatorze w 14 ml. płynu B, po czym wirowano ponownie przez 10 min. przy 14500 x g. Osad resuspendowano w 0,5—2 ml roztworu C w małym homogenizatorze teflonowym (Thomas Co.). Wszystkie czynności związane z preparowaniem frakcji cząstkowych przeprowadzano w temperaturze 0—4°C, używając przechłodzonych naczyń i płynów. Opisany sposób preparowania był zbliżony do stosowanych powszechnie metod otrzymywania aktywnych mitochondrii, wykazujących silny układ oksydazy kwasu bursztynowego (Bonner, Machlis 1957) i fosforylację tlenową (Freebairn, Remmert 1957).

Oznaczanie białka

Białko w preparatach frakcji cząstkowych oznaczano kolorymetrycznie metodą biuretową (Gornall, Bardewill 1949) z pewnymi modyfikacjami. Po płukaniu osadu etanolem 96% odparowywano alkohol zupełnie i osad rozpuszczano w 1 ml odczynnika biuretowego rozcieńczonego (4+1) wodą. Ponieważ żaden z badanych preparatów nie rozpuszczał się w odczynniku biuretowym bez reszty, a pozostawała pewna ilość bezbarwnego osadu, przeprowadzono próbę na reproduktywność metody i proporcjonalność reakcji barwnej do ilości podanego preparatu z tkanki marchwi. Próby wykazały zarówno proporcjonalność, jak i reproduktywność około 5%. Konieczne było jedynie dodatkowe wirowanie płynu barwnego przed pomiarem w spektrofotometrze przy 540 mμ.

Pomiary aktywności enzymów

Aktywność enzymów mierzono manometrycznie w naczynkach Warburga z bocznym tubusem, o pojemności całkowitej 7 ml, w temp. 25°C, przy oscylacji 120/min. Objętość całkowita fazy płynnej wynosiła 1 ml, wyrównanie termiczne — 10 min. Odczytów manometrycznych dokony-

wano co 5 minut, a dla pomiaru aktywności fenolaz również co 30 sekund. KOH do studzienek nie podawano.

Substrat dawano do bocznych tubusów. Po wyrównaniu termicznym zamykano układ i w odstępach 2 minut dokonywano kilku odczytów dla wykrycia ewentualnego autogenego zużycia tlenu, po czym przelewano z bocznego tubusa substrat i minutę po tym rozpoczynano właściwe pomiary. Naczynka Warburga w końcowych stężeniach zawierały:

Oksydaza kwasu askorbinowego (zasadniczo wg Dawsona i Magee (1955) z nieznacznymi zmianami):

AA (sól sodowa)	— 0,02 M
żelatyna	— 0,1%
bufor fosforanowy pH 6,0	— 0,13 M

pH mieszaniny po zakończeniu pomiaru wynosiło 6—6,2
Katecholaza:

Katechol (pirokatechina)	— 0,015 M
żelatyna	— 0,05%
bufor fosforanowy pH 7,0	— 0,13 M

pH mieszaniny po zakończeniu pomiaru wynosiło 6,5
Krezolaza: (Dawson, Magee, 1955):

p-krezol	— 0,015 M
żelatyna	— 0,1%
bufor fosforanowy pH 7,0	— 0,13 M

Odczynniki

Do przygotowania wszystkich odczynników oraz do mycia szkła używano wyłącznie wody podwójnie destylowanej z aparatu szklanego. Bufory fosforanowe wg Sörensena przygotowywano każdorazowo na świeżo przedestylowanej wodzie. Roztwory DDC sporządzano w buforze pH 7,0 w stęż. 0,1 M dla inhibicji AA—ox w homogenatach oraz 0,3 M dla inhibicji oddychania skrawków. Roztwory KCN dla inhibicji oddychania skrawków sporządzano w buforze pH 6,0 i korygowano do tego pH pod kontrolą elektrody szklanej.

WYNIKI DOŚWIADCZALNE

W tabeli 1 zebrano wyniki uzyskane z kilku oddzielnych doświadczeń. Każda liczba jest średnią z 2—3 równolegle prowadzonych pomiarów.

Tabela 1 — Table 1

Oddychanie (QO_2) i stopień jego zahamowania przez inhibitory oddechowe oraz wartości RQ skrawków tkanek roślinnych hodowanych in vitro. Wpływ inhibitorów podano w % zahamowania zużycia tlenu w czasie 20—140 minut od momentu podania inhibitora

Oxygen consumption (QO_2), its inhibition by respiratory inhibitors and RQ of slices of tissues cultivated in vitro. QO_2 expressed in μl O_2 per gram fresh mass per hour. The inhibition is given as the per cent decrease of QO_2 for the period of time between 20—140 minutes after inhibitor added

Tkanka Tissue	QO_2		RQ	KCN (pH = 6,0)			NaN_3 10^{-3} M	DDC(pH = 7,0)	
	pH-6	pH-7		10^{-4} M	10^{-3} M	5×10^{-3} M		5×10^{-4} M	2×10^{-3} M
<i>Daucus carota</i>	32	51	1,08	18	33	80	89	32	50
	54	40	1,12	14	54	83	80	33	47
	53	40	1,09	10	40		82		65
	66	51	0,95		40				65
Średnia Average	51	46	1,06	14	42	82	84	33	57
<i>Scorzonera hispanica</i>	41	53	0,73	27	44	65	72	33	74
	51	50	0,65	8	47	66	73	43	71
	63	40	0,57	18					
	63	39	0,77						
Średnia Average	51	45	0,68	18	45	66	73	38	73
<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	29	31	0,94	33	65	84	78	74	85
	32	32	0,90	54	81			81	
	40	30	1,01						
	40	31							
Średnia Average	35	31	0,95	44	73	84	78	78	85
<i>Opuntia monacantha</i>	21	22	0,59	7	44	—	75	14	48
	20	22	0,56	20	47		79	14	41
	22	19	0,55	14					
	18	23	0,57	11					
Średnia Average	20	22	0,57	13	46	—	77	14	45

Porównanie intensywności oddychania w buforze o pH 6,0 i 7,0 wykazuje nieznaczne różnice na korzyść pH 6,0, z wyjątkiem tkanki *Om* nie wykazującej zasadniczo różnicy pod tym względem.

Stosowanie dwóch różnych pH było wskazane ze względu na dodawane inhibitory (James 1953). Średnie wartości QO_2 są równe dla *Dc* i *Sh* (= 51), podczas gdy dla *Pt* i *Om* są znacznie niższe. Wartości RQ są wyraźnie różne dla poszczególnych tkanek. Są one zbliżone do 1 dla *Dc* i *Pt* i mniejsze od 1 (0,68 i 0,57) dla *Sh* i *Om*.

Tabela 2 — Table 2

Aktywność oksydaz miedziowych w całkowitych homogenatach tkanek wyrażona w $\mu\text{l O}_2/0,1 \text{ g}$ św. masy tkanki/godz. Do naczyniek Warburga dawano ekwiwalent 0,06 i 0,12 g św. masy tkanki na 1 ml ostatecznej objętości fazy płynnej

The activity of copper-oxidases in total homogenates of tissues expressed in $\mu\text{l O}_2$ per 0,1 g fresh mass of tissue per 1 hour. The equivalent of 0,06 or 0,12 g of the original tissue added to the Warburg flasks. Total volume of the fluid phase — 1 ml

Tkanka Tissue	AA-ox	Fenolaza Fenolase	
		akt. katechola- zowa catecholase activ.	akt. krezola- zowa cresolase activ.
<i>Opuntia monacantha</i>	6	0	0
<i>Scorzonera hispanica</i>	11	105	0—3
<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	13	36	0
<i>Daucus carota</i>	124	0	0

Jako inhibitorów oddechowych dla skrawków tkanek użyto KCN, NaN_3 i DDC. KCN w stężeniu końcowym 10^{-4} M jest słabym inhibitorem oddechowym dla większości tkanek (ok. 15% zahamowania). Jedynie wrażliwą w większym stopniu okazała się tkanka *Pt*, co być może jest spowodowane bardzo luźną strukturą tej tkanki, umożliwiającą łatwiejsze wnikiwanie inhibitora do wnętrza tkanki. KCN w stęż. 10^{-3} M hamuje oddychanie w ok. 45%, przy czym znowu w tkance *Pt* inhibicja jest wyższa i wynosi ok. 75%. Najwyższe użyte stężenie KCN $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ hamowało oddychanie *Dc* i *Pt* w ponad 80%, a *Sh* 65%. NaN_3 użyty w jednym tylko stężeniu 10^{-3} M , okazał się silnym inhibitorem i hamował oddychanie wszystkich tkanek w 75—85%.

NaN_3 i KCN dodawane były do skrawków w buforze o pH 6,0, DDC w buforze o pH 7,0. Niższe z użytych stężeń DDC ($5 \times 10^{-4} \text{ M}$) przyjmuje się jeszcze za specyficzne w swoim działaniu na oksydazy miedzio-

we, podczas gdy stężenia wyższe hamują również znacznie aktywność oksydazy cytochromowej (James, Garton 1952).

Uderzająco wysokie zahamowanie oddychania przez DDC znajdujemy w tkance *Pt*, co również może być wywołane strukturą tej tkanki, przy czym działanie DDC jest tu silniejsze niż innych inhibitorów. Najsłabsze hamowanie oddychania przez DDC ma miejsce w tkance *Om*, w której również w dalszym ciągu pracy nie wykryto oksydaz miedziowych.

Aktywności oksydaz miedziowych w całkowitych homogenatach z poszczególnych tkanek przedstawia tabela 2.

W tkance *Dc* jedynym wykrytym spośród badanych enzymów jest AA—ox. Po zagotowaniu homogenatu aktywność znika całkowicie, a DDC już w stężeniu 5×10^{-4} hamuje ją w 100%. Homogenat tkanki *Dc* nie wykazywał autogennego zużycia tlenu, podobnie jak homogenaty innych tkanek.

W tkance *Om* nie stwierdzono obecności fenolaz, a aktywność AA—ox jest bardzo słaba. Zagotowanie niszczy ją całkowicie. W tkance *Pt* obok słabej AA—ox stwierdzono prawie trzykrotnie wyższą od niej aktywność katecholazową. Zużycie tlenu przebiegało liniowo przez pierwsze 20 min. Aktywność ta była całkowicie hamowana przez zagotowanie.

W tkance *Sh* znaleziono słabą aktywność AA—ox. Zagotowanie homogenatu hamowało jedynie 75% jej aktywności. Zużycie tlenu po dodaniu katecholu przebiegało parabolicznie i wygasało po 10 minutach. Pomiary dokonywane co 30 sekund pozwoliły na wykreślenie liniowego odcinka krzywej w pierwszych dwóch minutach od momentu podania substratu. Aktywność podana w tabeli 2 jest obliczona na podstawie takiego odcinka. Zawartość naczyniek Warburga po kilkunastu minutach wybitnie ciemniała. Sam homogenat przechowywany przez 2 godziny w temp. 0°C nieznacznie ciemniał, w temp. 20°C bardzo szybko brunatniał.

Krótkotrwałość aktywności katecholazowej w tkance *Sh* wywołana jest prawdopodobnie obecnością toksycznych dla reakcji produktów utlenienia katecholu (Nelson, Dawson 1944).

Tkanka *Sh* wykazywała bardzo słabą, trudną do zmierzenia aktywność krezolazową, nie przekraczającą $3 \mu\text{O}_2/\text{godz}/0,1 \text{ g}$ tkanki.

Oznaczenia aktywności AA—ox, katecholazy i krezolazy dokonano również w preparatach frakcji cząstkowych tkanek *Om*, *Dc* i *Sh* uzyskanych sposobem opisanym w części metodycznej. Wykryto jedynie aktywność AA—ox w preparatach z tkanki *Dc* oraz aktywność katecholazową w preparatach z tkanki *Sh*. Dla dokładniejszego określenia lokalizacji wymienionych enzymów oznaczono ich aktywności również w innych frakcjach filtrowanych homogenatów tkanek *Sh* i *Dc*. Wyniki uży-

skane dla różnych frakcji filtrowanego homogenatu tkanki *Sh* przedstawia tabela 3. Z tabeli tej wynika, że aktywność katecholazowa w tkance *Sh* związana jest głównie z frakcją nie sedymentującą przy $11500 \times g$ w ciągu 15 minut. Nieznaczna aktywność wykryta w osadzie I, który nie był płukany, może w znacznej mierze pochodzić z resztek supernatantu, natomiast aktywność frakcji cząstkowej (płukanej płynem B) jest niewątpliwie związana z tą frakcją. Należy dodać, że supernatant pozostawiony w temperaturze pokojowej bardzo szybko brunatniał.

Tabela 3 — Table 3

Aktywność katecholazowa w poszczególnych frakcjach sączonego homogenatu tkanki *Scorzonera hispanica* wyrażona w $\mu l O_2/0,1 g$ św. masy/godz. Osad I — frakcja odwirowana przy $1000 \times g$ przez 8 min. Osad II — frakcja odwirowana przy $11500 \times g$ przez 15 min. Supernatant — pozostałość po odwirowaniu osadu II. Skład płynu A i C podany w części metodycznej pracy

The catecholase activity of individual fractions of the filtered homogenate from *Scorzonera hispanica* tissue, expressed in $\mu l O_2$ per 0,1 g fresh mass per hour. The I sediment obtained by centrifugation at $1000 \times g$ for 8 min, II sediment at $11500 \times g$ for 15 min. Supernatant includes all the constituents not sedimented by this force. Composition of the medium A and C explained in Summary

Frakcja Fraction	Aktywność Activity	% udziału danej frakcji w całkowitej aktywności filtrowanego homogenatu Part taken by given fraction in the activity of filtered homogenate (in %)
Supernatant (w płynie A) Supernatant (in medium A)	70	75
Osad I (w pł. C) I sediment (in medium C)	6	6,5
Osad II (w pł. C) (frakcja mitochondrialna) II sediment (in med. C) (mitochondrial fraction)	17	18,5

Gdy porównamy sumaryczną aktywność wszystkich frakcji filtrowanego homogenatu tkanki *Sh* ($= 93$) z aktywnością całkowitych homogenatów ($= 105$, tabela 2), widzimy, że na gruby osad odrzucany przy filtrowaniu homogenatu, a zawierający głównie fragmenty błon komórkowych, przypada najwyżej 10%. Tak więc należy uznać katecholazę w tkance *Sh* za enzym w głównej mierze rozpuszczalny (lub związany z cząstkami submitochondrialnymi), a w mniejszym stopniu związany z frakcją mitochondrialną tkanki.

Aktywność AA—ox w poszczególnych frakcjach filtrowanego homogenatu tkanki *Dc* przedstawia tabela 4. Pierwszym wnioskiem z tej ta-

beli jest mała wrażliwość AA—ox na wartość osmotyczną (różnica stężeń płynów A i C).

Frakcje badane w płynie A zawierającym EDTA posiadały podobne aktywności AA—ox jak frakcje w płynie C (bez EDTA). Brak inhibicji przez EDTA wskazuje na rzeczywistą aktywność AA—ox, a nie katalizę nieenzymatyczną jonów miedzi — kryterium wysunięte przez Hallaway i Butta (1958). We wszystkich frakcjach pobieranie tlenu było prawie całkowicie hamowane przez DDC w stężeniu końcowym $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ dodawanego do naczynek Warburga po 30 minutach wstępnych pomia-

Tabela 4 — Table 4

Aktywność AA-ox w poszczególnych frakcjach sączonego homogenatu tkanki *Daucus carota* wyrażona w $\mu\text{l O}_2/0,1 \text{ g św. masy/godz}$. Oznaczenia: Osad I, osad II, supernatant, płyn A i C — jak w tabeli 3. Cyfry w nawiasach oznaczają % zahamowania przez DDC o stężeniu końcowym $5 \times 10^{-4} \text{ M}$

The ascorbic acid oxidase activity in individual fractions of the filtered homogenate from *Daucus carota* tissue, expressed in $\mu\text{l O}_2$ per 0,1 g fresh mass per hour. The fractions as in Table 3.

Figures in parenthesis give the percent of the inhibition by DDC ($5 \times 10^{-4} \text{ M}$)

Frakcja Fraction	Aktywność AA-ox w płynie A Ascorbic acid oxidase activity in medium A	Aktywność AA-ox w płynie C Ascorbic acid oxidase activity in medium C	% udziału danej frakcji w płynie A w całkowitej akty- wności part taken by the fraction (in medium A) in the total acti- vity of filtered homogenate (in %)
Supernatant	17,8 (100)	—	64,5
Osad I I Sediment	4,1 (88)	3,6 (100)	14,8
Osad II II Sediment (frakcja mitochondrialna) (mitochondrial fraction)	5,7 (93)	5,7 (90)	20,7

rów. Z tabeli 4 wynika, że AA—ox zawarta jest we wszystkich badanych frakcjach filtrowanego homogenatu tkanki *Dc*, z wybitną przewagą supernatantu. Frakcja ta odpowiada frakcji cytoplazmatycznej wg Hansla (1955). Ponieważ supernatant nie był dalej frakcjonowany, nie można rozstrzygnąć, czy znaleziona aktywność AA—ox pochodzi z frakcji rzeczywiście rozpuszczalnej, czy też ze struktur submitochondrialnych.

Wobec panującego poglądu, wg którego aktywność AA—ox ma być związana z frakcją ścian komórkowych („cell-wall fraction“) (Honda 1955, Hansl 1955) należy zaznaczyć, że jedynie osad I mógł fragmenty ścian zawierać. Obliczenie różnicy pomiędzy aktywnością całkowitego homogenatu (= 124, tab. 2) i sumaryczną aktywnością wszystkich frakcji sączonego homogenatu (= 27,6, tab. 4) wskazuje, że w najgrubszym osadzie zawierającym główną masę błon komórkowych musi być zawarte ponad 75% całkowitej aktywności AA—ox. Biorąc jednak pod uwagę brak sacharozy w całkowitych homogenatach, która wg Butta i Hallaway (1958) zwiększa rozpuszczalność tego enzymu, proporcja ta, być może, przesunięta jest na korzyść frakcji rozpuszczalnej.

Tabela 5 — Table 5

Zawartość białka i aktywność AA-ox w poszczególnych frakcjach sączonego homogenatu *Daucus carota*. Wszystkie frakcje w płynie A

Protein content and ascorbic acid oxidase activity in individual fractions of filtered homogenate from *Daucus carota* tissue. All fractions in medium A. For the other conditions see Table 3 and 4.

Frakcja Fraction	mg białka w całej obj. frakcji mg protein in the whole fraction	% zawartość białka percentage (of the fraction) of the pro- tein	aktywność AA-ox na 1 mg białka AA-oxidase activity per 1 mg protein	Aktywn. AA-ox całej frakcji AA-oxidase activity of the total fraction	% udziału frakcji w całkowitej aktyw. percentage of the total AA-oxidase activity
Supernatant	25	73,5	92	2300	63,5
Osad I I Sediment	2,9	8,5	188	545	15,0
Osad II II Sediment	6,1	18,0	128	781	21,5

Bardzo zbliżone proporcje w rozkładzie aktywności AA—ox uzyskujemy przy przeliczeniu aktywności na ilość białka zawartego w poszczególnych frakcjach sączonego homogenatu tkanki Dc. Wyniki te przedstawia tabela 5.

DYSKUSJA

Dobór tkanek roślinnych hodowanych *in vitro*, reprezentujących nie tylko cztery różne gatunki, ale i różne typy fizjologiczne tkanek — był przypadkowy. Tkanki te przedstawiają różny typ metabolizmu oddechowego.

wego, o czym świadczą już różne zapotrzebowania tlenowe (wszystkie tkanki hodowane były w tych samych warunkach) oraz różne współczynniki oddechowe. Daje to możliwość skonfrontowania wyników uzyskanych identycznymi metodami na tak różnym materiale i w ten sposób pomóc w interpretacji tych wyników.

Oddychanie skrawków tkanek badane było bezpośrednio po ich pocięciu i dwugodzinnym płukaniu roztworem buforowym bez równoczesnego przewietrzania w celu uniknięcia głębokich zmian zachodzących w skrawkach tkanek przy przewietrzaniu. Są to zmiany wrażliwości na dwunitrofenol i malonian (Laties 1959) oraz cyjanek i CO (Calo, Marks, Varner 1957, Thimann, Yocum, Hackett 1954). W efekcie tych zmian następuje przesunięcie w aktywności oksydaz końcowych i prawdopodobnie synteza dodatkowej oksydazy cytochromowej, której ilości były uprzednio czynnikiem ograniczającym oddychanie skrawków, co z kolei prowadzi do zwiększenia zapotrzebowania tlenowego (Calo, Marks, Varner 1957). Proces tych zmian, podlegający wpływom różnych warunków zewnętrznych (Laties 1959 a), trudny jest do skontrolowania.

Wszystkie badane tkanki są wrażliwe, jakkolwiek w różnym stopniu, na inhibicję cyjankiem i azydkiem, co świadczy o udziale oksydaz żelazowych i miedziowych w oddychaniu tych tkanek. Inhibicja DDC może być interpretowana jako specyficzna dla oksydaz miedziowych jedynie w niższym stężeniu (5×10^{-4} M) tego inhibitora (James, Garton 1952).

O ile chodzi o oksydazę kwasu askorbinowego — trzeba przyjąć jej brak w tkance *Om* oraz niewielką aktywność w tkankach *Sh* i *Pt*. W tkance *Dc* jest ona stosunkowo wysoka. Aktywność tę należy uznać za enzymatyczną ze względu na jej całkowity zanik po zagotowaniu, liniowy charakter przebiegu reakcji oraz niewrażliwość na EDTA (M apson 1958).

Rozkład aktywności oksydazy kwasu askorbinowego na poszczególne frakcje homogenatu tkanki *Dc* zgadza się z doniesieniami o lokalizacji tego enzymu w obrębie komórki roślinnej (M apson 1958). Inhibicja oddychania skrawków tkanki *Dc* przy użyciu DDC, jakkolwiek niezupełnie specyficzna, sugeruje możliwość działania tego enzymu w pewnym stopniu jako oksydazy końcowej, zwłaszcza gdy porównamy dwukrotnie wyższą wrażliwość tkanki *Dc* na ten inhibitor w stosunku do nie zawierającej aktywniejszych oksydaz miedziowych tkanki *Om* oraz weźmiemy pod uwagę nieobecność w tkance *Dc* oksydazy polifenolowej. Oksydaza kwasu askorbinowego nie może być jednak główną oksydazą końcową tej tkanki, ponieważ cyjanek i azydek są dla niej silniejszymi inhibitorami niż DDC. Zgadza się to również z faktem, że oksydaza kwasu askorbinowego w tkance *Dc* zlokalizowana jest głównie we frakcji błon

komórkowych, a wg doniesień Butta i Hallaway (1958) oksydaza ta nie bierze udziału w oddychaniu.

Aktywną katecholazę znaleziono jedynie w tkance *Sh* i *Pt*. W tkance *Sh* aktywność ta, jakkolwiek trzykrotnie wyższa, jest bardzo krótkotrwała w warunkach pomiaru, co dowodzić może hamującego wpływu produktów utleniania katecholu. Stąd też nie można wnioskować o wyższej aktywności katecholazy *in vivo* w tkance *Sh* w porównaniu z *Pt*.

Aktywność katecholazowa tkanki *Sh* zlokalizowana jest głównie we frakcji supernatantu po odwirowaniu przy 11500 x g przez 15 minut. zawierającego również cząstki submitochondrialne. Pozostaje to w zgodzie z ogólnym poglądem na rozpuszczalny charakter tej oksydazy (Bonner 1957).

Wrażliwość oddychania tkanek *Sh* i *Pt* na DDC (przeszło dwukrotnie wyższa od nie zawierającej oksydaz miedziowych *Om*) przy równoczesnym braku aktywniejszej oksydazy kwasu askorbinowego dopuszcza wniosek o jej działaniu jako oksydazy końcowej w tych tkankach.

ZESTAWIENIE WYNIKÓW

1. Skrawki badanych tkanek wykazują zapotrzebowanie tlenowe wynoszące średnio: dla tkanek *Dc* i *Sh* — 51, dla *Pt* — 35, dla *Om* — 20 μ l. O_2 /g św. masy/godz. Współczynniki oddechowe są zbliżone do 1 dla tkanek *Dc* i *Pt* i mniejsze od 1 (0,68 i 0,57) dla tkanek *Sh* i *Om*.

2. KCN w stęż. 10^{-4} M hamuje oddychanie skrawków w ok. 15%, a w stęż. 10^{-3} w ok. 45% (z wyjątkiem tkanki *Pt*). NaN_3 w stęż. 10^{-3} M hamuje oddychanie w 75—85%.

3. Aktywną oksydazę kwasu askorbinowego znaleziono w tkance *Dc*. Aktywność ta jest związana głównie z frakcją błon komórkowych (ok. 75%) i w mniejszym stopniu (ok. 14%) z frakcją nie sedymentującą przy 11500 x g w ciągu 15 min.

4. Aktywną katecholazę znaleziono w tkankach *Pt* i *Sh*, przy czym w tkance *Sh* jest ona krótkotrwała i wygasa po 10 minutach. Aktywność katecholazowa związana jest głównie z frakcją nie sedymentującą przy 11500 x g w ciągu 15 min.

5. Inhibicja oddychania skrawków przy użyciu DDC w stężeniu 5×10^{-4} M jest przeszło dwukrotnie silniejsza w tkankach, w których stwierdzono obecność oksydaz miedziowych, niż w tkance *Om*, w której oksydaz tych nie znaleziono.

SUMMARY

It has been stated in recent years that the respiratory processes in the higher plants concerning both reaction paths and their localisation within plant cells are similar to analogous processes in animal tissues (Millerd, Bonner 1953, Hackett 1955, 1959, James 1957, Hartree 1957, Smith, Chance 1958).

The specific problem in plants is still unexplained function of copper oxidases and their possible participation in plant respiration (Bonner 1957, Mapson 1958).

Numerous investigations were conducted on the respiratory mechanism in different organs of very numerous higher plant species but little attention was paid to plant tissues cultivated in vitro (Czosnowski 1952, Camus, Lence 1955, Morel, Demetriades 1955, Loo, Lie 1957, Gentile, Naylor 1955).

The purpose of the present work was to investigate the respiratory enzymes of several plant tissues, cultivated in vitro. In particular the oxygen uptake of tissue slices, their respiratory quotients, the effect of respiratory inhibitors, and the presence of copper oxidases: ascorbic acid oxidase, catecholase and cresolase were investigated.

Material and methods

Four tissues were used for the investigations (Gautheret 1954):

Tissue species	Type of tissue
<i>Daucus carota</i>	anergized
<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	"
<i>Scorzonera hispanica</i>	Crown-Gall
<i>Opuntia monacantha</i>	" "

All tissues were cultivated at 24°C, exposed to continuous, fluorescent light (600 lux), on the Heller's (1952) mineral nutrient with 2% sucrose and 0,6% agar added.

The oxygen uptake was measured using tissue slices 0,5 mm thick washed for 2 hours in 1/15 M phosphate buffer (Na/K) pH 6.0 or 7.0 (when DDC was used as inhibitor), at room temperature. The measurements of oxygen uptake, respiratory quotients, and influence of respiratory inhibitors were made in Warburg apparatus placing 0,7 g of tissue slices in 2,5 ml buffer solution (the same as was used for washing) in one Warburg flask.

With regard to individual differences among the tissues the respiratory inhibitors were added to the same tissue slices whose oxygen uptake had been previously measured. Using KCN, we added it also to the KOH in central vessel according to the proportions given by Krebs (1935). The tissue homogenates were made by grinding the tissue with 0,18 M phosphate buffer of pH 6,5 or 7,0 in a cooled mortar and subsequently homogenizing in a teflon homogenizer. Three solutions were used for the

particulate fraction preparations: A — 0,4 M sucrose, 0,002 M EDTA, 0,1 M phosphate buffer (Na/K) pH 7,0; B — 0,4 M sucrose, 0,01 M phosphate buffer pH 7,0; C — 0,2 M sucrose, 0,005 M phosphate buffer pH 7,0. The tissues were ground in mortar with A-solution. The pulp was then filtered through the muslin. The filtrate was centrifuged by $1000 \times g$ for 8 minutes (S I). The supernatant was centrifuged by $11500 \times g$ for 15 minutes. The sediment was resuspended in solution B and then centrifuged by $14500 \times g$ for 10 minutes. The sediment (S II) was resuspended in 0,5 — 2 ml solution C. All the operations were made at $0 - 4^{\circ}\text{C}$.

The activities of copper oxidases were measured with manometric method at 25°C . The final concentration in Warburg flasks were as follows:

For ascorbic acid oxidase (Dawson, Magee 1955)	sodium ascorbate	0,02 M	
	gelatine	0,1%	
	phosphate buffer	0,13 M	pH 6,0
Catecholase	catechol	0,015 M	
	gelatine	0,05%	
	phosphate buffer	0,13 M	pH 7,0
Cresolase	cresol	0,015 M	
	gelatine	0,1%	
	phosphate buffer	0,13 M	pH 7,0

The protein estimations were done according to Gornall's method (Gornal, Berdewill, David 1949).

Experimental results

The results of several independent experiments are put together in Table 1. Every figure represents the average of 2—3 simultaneous measurements. The average oxygen uptake was equal in *Daucus* and *Scorzonera* tissues and it was higher than in case of *Opuntia* or *Parthenocissus*. The respiration in buffer solution at pH 6,0 is a little more intense (except *Opuntia*) than at pH 7,0.

The respiratory quotients are different in separate tissues, which indicates the differences in their respiratory metabolism. The RQ-values are close to unity in *Daucus* and *Parthenocissus*, and smaller than unity (0,68 and 0,57) in *Scorzonera* and *Opuntia*. KCN in concentration of 10^{-4}M inhibits the respiration in about 15% and in conc. of 10^{-3}M in about 45%. *Parthenocissus* is the only exception, because it has a very loose structure and the high inhibition may be due to easier penetration of the inhibitor into tissue slices. NaN_3 in concentration of 10^{-3}M inhibits the respiration of all tissues in 75—85%. DDC in concentration of $5 \times 10^{-4}\text{M}$ strongly inhibits the respiration of *Parthenocissus* and very little that of *Opuntia*.

The Table 2 shows the activities of copper oxidases in tissue homogenates. *Daucus* has the most active ascorbic acid oxidase and *Opuntia* tissue the least active. The activity is completely inhibited by heating and by adding DDC in final concentration of 5×10^{-4} M. The reaction is linear during the first 30 minutes. The catecholase activity in *Parthenocissus* tissue is durable and linear during the first 20 minutes. In the course of measurements the homogenate strongly darkens unlike the homogenate without catechol added. Although the catecholase activity in *Scorzonera* tissue is stronger, it is not durable and after 10 minutes the reaction stops. The homogenate both without or with catechol becomes dark.

The results in Table 3 indicate, that the catecholase in *Scorzonera*, tissue seems to be a soluble enzyme.

The results in Table 4 indicate low sensitivity of ascorbic acid oxidase in *Daucus* tissue to osmotic value and to EDTA. The ascorbic acid oxidase appears in all fractions of filtered homogenate from *Daucus* tissue with a considerable prevalence of supernatant (after centrifugation at $11500 \times g$ for 15 min.). Very similar results can be obtained by calculating the ascorbic acid activity per 1 g fresh mass of the tissue (Tab. 4), as per 1 mg of protein in separate fractions (Tab. 5).

The comparison of the sum of ascorbic acid oxidase activities in all fractions of filtered homogenate with the activity of unfiltered homogenate shows, that about 75% of total activity is connected with the cell wall fragments which are removed by the filtration.

Discussion

The investigated tissues demonstrate different types of respiratory metabolism, which may be proved by their different oxygen requirements and different respiratory quotients. The tissue slices were not aerated before the measurements in order to avoid considerable changes which take place in respiratory metabolism of the tissues as a result of aeration (Thimann, Yocum, Hackett 1954, Calo, Marks, Varner 1957, Laties 1959, 1959 a).

All investigated tissues appeared sensitive to cyanide and azide, although in different extent which indicates the participation of iron- and copper-oxidases in their respiration. DDC inhibition may be interpreted as specific for copper-oxidases only in lower concentration (5×10^{-4} M) (James, Garton 1952). Ascorbic acid oxidase activity, which is comparatively high in *Daucus* tissue may be considered as enzymatic because of its complete disappearance after boiling, the linear course of the reaction, and the intensity to EDTA (Butt, Hallaway 1958). The distribution of the ascorbic acid oxidase activity in separate fractions of homogenates from *Daucus* tissue is in accordance with the reports on the localisation of this enzyme within plant cells (Honda 1955, Hansl 1955).

The active catecholase was found in *Parthenocissus* and *Scorzonera* tissues. In *Scorzonera* this activity is very short and this may indicate the inhibition by the oxidizing products of catechol. The activity is generally

located in supernatant after centrifugation at $11500 \times g$ in 15 minutes, which also contains submitochondrial particles. It confirms with the general opinion that the catecholase is the soluble oxidase (Bonner 1957, James 1957).

As regards the participation of copper-oxidases in the respiration of investigated tissues the obtained results permit to conclude that there exists a possibility of ascorbic acid oxidase participation in *Daucus* and catecholase in *Scorzonera* and *Pathenocissus* tissues. The sensitivity of these tissues on $DDC 5 \times 10^{-4} M$ is greater than in *Opuntia* tissue, in which no considerably active copper-oxidases were found.

LITERATURA

- Bonner W. D., 1957, Soluble oxidases and their functions, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 8: 427.
- Bonner B. A., Machlis J., 1957, Respiration of the mycelia and mitochondria of the filamentous watermold *Allomyces macrogynus*, *Plant Physiol.* 32: 291.
- Brown J. C., Steinberg R. A., 1953, Iron and copper enzymes in leaf lamina of tobacco when deficient in micronutrients or grown on calcareous and organic soils, *Plant Physiol.* 28: 438.
- Butt V. S., Hallaway M., 1958, Ascorbic acid oxidase activity in extracts from higher plants, *Biochem. J.*, 69: 20.
- Calo N., Marks J., Varner J. E., 1957, Respiratory metabolism of aerated potato disks, *Nature* 180: 1142.
- Camus G., Lence C., 1955, Action de la pénicilline G sur le développement de tissus végétaux cultivés in vitro, *Ann. Biol.* 31:
- Čajlachjan M. H., Bojarkin A. N., 1955, Wlijanije dliny dnia na aktivnost' oksidativnykh fermentov v rastenijach, *DAN SSSR*, 105: 592.
- Czosnowski J., 1952, Charakterystyka fizjologiczna trzech typów tkanek *Vitis vinifera*: normalnej, tumora bakteryjnego (Crown-Gall) i tumora chemicznego, hodowanych in vitro, *PTPN Prace Kom. Biol.* 13: 189.
- Dawson C. R., Magee R. J., 1955 *Plant tyrosinase*, *Methods in enzymology* II, Colowick S. P., Kaplan N. O. 987 pp. Acad. Press, New York.
- Dawson C. R., Magee R. J., 1955, Ascorbic acid oxidase, *Ibidem*.
- Eichenberger E., Thimann K. V., 1957, Terminal oxidases and growth in plant tissues. IV. On the terminal oxidases of etiolated pea internodes, *Arch. Biochem. Biophys.* 67: 468.
- Fortini S., 1956, Respirazione, catalasi, catecolo ossidasi e contenuto in acido ascorbico in relazione all'età dei tessuti fogliari di alcune specie vegetali, *Nota I Ann. sperim. agrar.* 10: 195.
- Freebairn H. T., Remmert L. F., 1957, Oxidative phosphorylation by sub-cellular particles from cabbage, *Plant Physiol.* 32: 379.
- Gautheret R. J., 1954, Catalogue des cultures de tissus végétaux, *Rev. gén. Bot.* 61: 672.
- Gautheret R. J., 1959, *La culture des tissus végétaux*, Masson, Paris.
- Gentile A. C., Naylor A. W., 1955, The metabolism of *Rumex* virus tumors. Terminal respiratory enzymes, *Physiol. Plantarum* 8: 682.
- Goodard D. R., Stafford H. A., 1954, Localization of enzymes in the cells of higher plants, *Ann. Rev. Plant physiol.* 5: 115.

- Gornall A. G., Bardewill C. J., David M. M., 1949, Determination of serum protein by means of the biuret reaction, *J. Biol. Chem.* 177: 751.
- Hackett D. P., Schneiderman H. A., 1953, Terminal oxidases and growth in plant tissues. I. The terminal oxidase mediating growth of *Avena coleoptile* and *Pisum* stem sections, *Arch. Biochem. Biophys.* 47: 190.
- Hackett D. P., Schneiderman H. A., Thimann K. V., 1953, Terminal oxidases and growth in plant tissues. II. The terminal oxidase mediating water uptake by potato tissue, *Arch. Biochem. Biophys.* 47: 205.
- Hackett D. P., 1959, Respiratory mechanisms in higher plants, *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 10: 113.
- Hackett D. P., 1955, Recent studies on plant mitochondria, *Int. Rev. Cytol.* 4: 143.
- Hansl N. R., 1955, Respiratory enzyme systems of *Avena* and their influence on growth, *Österr. Akad. Wiss., Math.-naturw.* 164: 25 (Chemical Abstracts 50: 5846, 1956).
- Hartree E. F., 1957, Cytochrome in higher plants, *Advanc. Enzymol.* 18: 1.
- Heller R., 1952, Recherches sur la nutrition minérale de tissus végétaux cultivés in vitro, Thèse, Paris 223 pp.
- Honda S. J., 1955, Ascorbic acid oxidase in barley roots, *Plant Physiol.*, 30: 174.
- Howard F. D., Yamaguchi M., 1957, Respiratory and the oxidative activity of particulate fractions from developing pepper fruits (*Capsicum annuum* L.), *Plant Physiol.* 32: 418.
- Howard F. D., Yamaguchi M., 1957, Hydrogen transport and oxidative phosphorylation by particulates from developing pepper fruits. *Plant Physiol.* 32: 424.
- James W. O., Garton N., 1952, The use of sodium diethyldithiocarbamate as a respiratory inhibitor, *J. exp. Bot.* 3: 310.
- James W. O., 1953, The terminal oxidases of plant respiration, *Biol. Rev.* 28: 254.
- James W. O., 1953, The use of respiratory inhibitors, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 4: 59.
- James W. O., 1954, Reaction path in plant respiration, *Endeavour* 13: 155.
- James W. O., 1957, Reaction path in the respiration of the higher plants, *Advanc. Enzymol.* 18: 281.
- James W. O. Das V. S. R., 1957, The organization of respiration in chlorophyllous cells, *New Phytol.* 56: 325.
- James W. O., Lundegårdh H., 1959, The cytochrome system of young barley roots. *Proc. Roy. Soc. Ser. B.* 150: 7.
- Krebs H. A., 1935, Metabolism of aminoacids. III. Deamination of aminoacids. *Biochem. J.* 29: 1620.
- Laties G. G., 1954, The osmotic inactivation in situ of plant mitochondrial enzymes, *J. exp. Bot.* 5: 49.
- Laties G. G., 1959, The nature of the respiratory rise in slices of chicory roots, *Arch. Biochem. Biophys.*, 79: 364.
- Laties G. G., 1959, The development and control of coexisting respiratory systems in slices of chicory root, *Arch. Biochem. Biophys.* 79: 378.
- Lieberman M., Biale J., 1955, Effectiveness of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in the activation of oxidations mediated by mitochondria from broccoli buds, *Plant Physiol.* 30: 549.
- Lieberman M., 1958, Isolation of cytoplasmic particles with cytochrome oxidase activity from apples, *Science* 127: 189.
- Loo S. W., Lie S. H., 1957, Tyrosinase in plant tissues cultures, *Acta Bot. Sinica*, 6: 281 (cyt. za Gautheret'em, 1959).

- Lundegårdh H., 1954, Anion respiration. The experimental basis of the theory of absorption, transport and exudation of electrolytes by living cells and tissues, Symposia Soc. exp. Biol. VIII.
- Mapson L. W., 1958, Metabolism of ascorbic acid in plants. Part I. Function, Ann. Rev. Plant Physiol. 9: 119.
- Millerd A., Bonner J., 1953, The biology of plant mitochondria, J. Histochem. Cytochem. I: 254.
- Morel G., Démétriades S., 1955, Action de régulateurs de croissance sur l'activité oxydasique des tissus de Topinambur, Ann. Biol. 31: 227.
- Nelson J. M., Dawson C. R., 1944, Tyrosinase, Advanc. Enzymol., 4: 99.
- Pierpoint W. S., 1959, Mitochondrial preparations from leaves of tobacco (*Nicotiana tabacum*), Biochem. J. 71: 518.
- Rubin B. A., 1955, O prispособitelnom charakterie dychanija rastienij, Izv. Akad. Nauk SSSR ser. Biol. 1955: 63.
- Rubin B. A., Černavina I. A., Micheeva A. V., 1955, Wlijanije swieta na aktivnost' citochromoksidazy, DAN SSSR 105: 1039.
- Sisakjan N. M., Bekina R. M., Mosolova I. M., 1957, O cykloforaznoj aktiwnosti strukturnych elementov rastitelnoj kletki, DAN SSSR 112: 981.
- Smillie R., 1955, Mitochondria in green leaves, Aust. J. Sci. 17: 217.
- Smillie R., 1956, Enzymic activities of subcellular particles from leaves. I. The occurrence of mitochondria in green leaves of the pea plant, Aust. J. Biol. Sci. 9: 81.
- Smith L., Chance B., 1958, Cytochromes in plants, Ann. Rev. Plant Physiol. 9: 449.
- Thimann K. V., Yocum C. S., Hackett D. P., 1954, Terminal oxidases and growth in plant tissues. III. Terminal oxidation in potato tuber tissue, Arch. Biochem. Biophys. 53: 239.
- Vager R. M., 1955, Izmenienije aktiwnosti dychatielnych fiernientow rastienij pri wirusnoj infekcji. Ž. Obšč. Biol. 16: 298.
- Weinstein L., Robbins W. R., 1955, Effect of light on the catalase and cytochrome oxidase activities of leaf tissues of green and albino sunflower plants, Contr. Thompson Inst. 18: 225.