Oksydazy końcowe tkanek roślinnych hodowanych *in vitro*. Cz. II. DPNH-cytochromo c reduktaza, bursztyno-cytochromo c reduktaza i oksydaza cytochromu c we frakcjach czą- stkowych tkanek

Terminal oxidases in plant tissues cultivated in vitro.

II. *DPNH-cytochrome c reductase, succino-cytochrome c reductase and
cytochrome c oxidase in particulate fractions of the tissues.*

JADWIGA MICHEJDA, JAN MICHEJDA

WSTĘP

W kontynuacji badań nad oksydazami końcowymi kilku tkanek roślin-
nych hodowanych *in vitro* (Michejda 1960) przebadano aktywność en-
zymów układu cytochromowego w preparatach frakcji cząstkowych tych
tkanek, a mianowicie — oksydazy cytochromowej i reduktaz DPNH-
i bursztynowej cytochromu c. Porównano aktywność poszczególnych en-
zymów w czterech rodzajach tkanek oraz ustalono proporcje ich aktyw-
ności w obrębie każdej z tych tkanek.

Skróty stosowane w pracy:

- Dc — tkanka *Daucus carota*
- Pt — tkanka *Parthenocissus tricuspidata*
- Sh — tkanka *Scorzonera hispanica*
- Om — tkanka *Opuntia monacantha*
- DPN — nukleotyd dwufosfopirydynowy
- DPNH — nukleotyd dwufosfopirydynowy zredukowany
- osmM — osmo-mole.

MATERIAŁ I METODY

Tkanki

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

Gatunek	Typ tkanki
1. <i>Daucus carota</i>	anergizowana
2. <i>Parthenocissus tricuspidata</i>	"
3. <i>Scorzonera hispanica</i>	Crown-Gall
4. <i>Opuntia monacantha</i>	" "

Tkanki hodowano w temperaturze 24°C na stałym świetle sztucznym (lampy jarzeniowe, intensywność oświetlenia — 600 lux), w probówkach 23×120 mm, zawierających po 12,5 ml pożywki. Skład pożywki dla wszystkich tkanek był jednakowy: pożywka mineralna wg Hellera (1952), sacharoza 2‰, agar 0,6‰.

Doświadczenia przeprowadzano w miesiącach od kwietnia do lipca na tkankach rosnących 6—7 lub 9—10 tygodni od przeszczepienia. Preparowanie frakcji cząstkowych oraz oznaczenia białka w tych frakcjach dokonywano w sposób opisany w części I (Michejda 1960).

Spektrofotometryczne pomiary aktywności enzymów

Pomiarów dokonywano przy pomocy spektrofotometru Hilgera H-700 używając kiuwet szklanych o długości drogi światła 1 cm. Całkowita objętość płynu w kiuwecie wynosiła 1 ml. Stosowano specjalny system przesłon zmniejszający wysokość szczeliny wyjściowej spektrofotometru. Temperatura pomieszczenia pomiarowego utrzymywana była na stałym poziomie 24 lub 27°C.

Oksydazę cytochromową oznaczano wg systemu L. Smith (1955) mierząc spadek ekstynkcji przy 550 mμ. Kiuwety pomiarowe zawierały w stężeniach końcowych:

bufor fosforanowy wg Sörensena pH 7,0	0,025 M
cytochrom c zredukowany	$2,6 \times 10^{-5} M$
KCl zmienne ilości, najczęściej	0,015 M

W kiuwecie kontrolnej opuszczano zredukowany cytochrom c.

DPNH-reduktaza cytochromu c. Redukcję cytochromu c przez DPNH mierzono przy 550 mμ.

Skład kiuwet pomiarowych w stężeniach końcowych był następujący:

bufor fosforanowy wg Sörensena pH 7,0	0,025 M
KPNH	10^{-4} M*
cytochrom c utleniony	$2,6 \times 10^{-5}$ M
KCN	10^{-3} M
KCl zmienne ilości, najczęściej	0,01 M

W kiuwecie kontrolnej opuszczano jedynie cytochrom c.

Bursztyno-reduktaza cytochromu c. Redukcję cytochromu c przez bursztynian mierzono również przy 550 m μ . Stężenie końcowe w kiuwetach pomiarowych wynosiło:

bufor fosforanowy wg Sörensena pH 7,0	0,025 M
bursztynian sodu	0,01 M
cytochrom c utleniony	$2,6 \times 10^{-5}$ M
KCN	10^{-3} M
KCL nie dodawano	

W kiuwecie kontrolnej opuszczano jedynie utleniony cytochrom c.

We wszystkich przypadkach końcowej redukcji cytochromu w kiuwecie pomiarowej dokonywano przez dodanie $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ w substancji. Odczynniki podawane były do kiuwet zawsze przynajmniej 10 minut przed pomiarem i umieszczane w kabinie pomiarowej dla wyrównania termicznego. Po kilku pomiarach wstępnych, mających ustalić aktualny poziom cytochromu c, wprowadzano preparat, najczęściej w ilości 10 μl , mikropipetką przewieszoną (co odpowiadało przeciętnie 10—20 μg białka).

Zmiany ekstynkcji mierzono co 10 sekund w przypadku oksydazy cytochromowej, a co 15 sekund w przypadku obu reduktaz. Z reguły odczytywano równocześnie 2 kiuwety pomiarowe wobec jednej kontrolnej. Reproduktywność wyników w obu kiuwetach była bardzo duża.

Odczyty kontynuowano przez 3—5 min. od momentu dodania preparatu, czasami przedłużając ten okres do kilkunastu minut dla ustalenia punktu równowagi między oksydazą i reduktazą cytochromu c. Aktywność enzymatyczną preparatów obliczano jako $\mu\text{M} \times 10^{-2}$ cyt. c utlenionego lub zredukowanego /2 min./ mg białka preparatu. Podstawą kalkulacji były odczyty ekstynkcji od 30 sekundy do 2 minuty pomiaru. Nawet przy stosowaniu bardzo aktywnych preparatów, dających różnice ekstynkcji ok. 0,100/min., odcinek ten był liniowy dla oksydazy cytochromowej, a więc tym bardziej dla reduktaz. Jako współczynniki molowej ekstynkcji przyjęto (Umbreit, Burris, Stauffer 1957): $\alpha_{\text{cyt}_{\text{red}}} = 0,281 \times 10^2 \text{ cm}^2/\mu\text{M}$ $\alpha_{\text{cyt}_{\text{ox}}} = 0,090 \times 10^2 \text{ cm}^2/\mu\text{M}$.

* DPNH rozpuszczony w roztworze buforowym podwyższał wartość osmotyczną płynu w kiuwecie pomiarowej o ok. 0,01 osmM.

Odczynniki

Cytochrom preparowano wg Keilina (1952) z serc wołowych dializując preparat wobec 0,50% NaCl. Cytochrom przechowywano z dodatkiem chloroformu w temperaturze 0°C. Każdorazowo przed pomiarami świeże porcje cytochromu uwalniano od chloroformu przez odparowanie w temperaturze pokojowej.

Redukcję cytochromu c przeprowadzano wobec azbestu palladowego, systemem opisanym przez Nielsena i Lehningera (1955). Wobec małego rozpowszechnienia tej metody, przy równoczesnych trudnościach w uzyskaniu daleko posuniętej redukcji wg znanej metody L. Smith, podajemy poniżej dokładny przepis redukcji:

Wyjściowy roztwór cytochromu o stężeniu 5×10^{-4} M, po usunięciu chloroformu doprowadza się do pH 7,4 przy użyciu NaOH 1 N pod kontrolą elektrody szklanej. Cytochrom ten rozcieńcza się do stęż. około 4×10^{-4} M wodą bidestylowaną i umieszcza w płuczce gazowej razem z 10% azbestem palladowym. Azbest palladowy kupny lub po preparacji należy dokładnie przemyć gorącą destylowaną wodą. Wylot rurki dla gazu w płuczce z cytochromem powinien znajdować się kilka mm nad poziomem płynu, a grubość warstwy tego płynu nie powinna przekraczać kilku mm. Płuczka z cytochromem zostaje dołączona do systemu doprowadzającego gaz wg poniższego schematu:

Ryc. 1. Schemat zestawu do redukcji cytochromu c
The scheme of the set for cytochrome c reduction

Przed dołączeniem płuczki z cytochromem należy usunąć z układu tlen przez kolejne przepuszczenie przez niego najpierw wodoru przez 30 sekund, potem azotu przez 3 minuty. Następnie podłącza się płuczkę z cytochromem i przepuszcza azot przez 15 minut, potem wódór przez 45 minut. Barwa cytochromu zmienia się po ok. 20 minutach w wiśniową. Z kolei przepuszcza się przez najwyżej 5—10 minut azot dla usunię-

cia resztek wodoru, który mógłby wytworzyć później H_2O_2 . Przez cały czas redukcji co kilka minut mieszamy bardzo ostrożnie roztwór cytochromu dla ułatwienia wymiany gazowej, unikając jednakże wytwarzania piany, która sprzyja denaturacji cytochromu i przechodzeniu jego w formę samoutlenialną. Następnie jak najszybciej przelewamy roztwór cytochromu na mały sączełk piankowy G3 lub G4 i sączyemy pod próżnią cytochrom do małych pojemników szklanych ze szlifem uszczelnianym smarem silikonowym. W pojemnikach tych należy zostawić jak najmniej fazy gazowej, którą należy po każdorazowym otwarciu naczynia uzupełnić azotem.

W powyższy sposób uzyskany cytochrom jest zredukowany w około 90—95% wykazując wskaźnik $\frac{E_{550}}{E_{565}} = 12 - 14$.

Ponieważ do pomiarów aktywności oksydazy cytochromowej wystarcza już wskaźnik 6, ten sposób redukcji należy uznać za bardzo korzystny. Samoutlenialność takiego cytochromu w kiuwetach pomiarowych jest znikoma i nie przekracza spadku ekstynkcji 0,001/min. przy użyciu stężenia cytochromu $2,6 \times 10^{-5}$ M. Użyteczna trwałość zredukowanego cytochromu przechowywanego w temp. — 10°C sięga jednak tylko 30 godzin, po których wskaźnik $\frac{E_{550}}{E_{565}}$ spada poniżej 6. Jako utlenionego cytochromu używano podobnie jak Shappirio i Williams (1957) normalny preparat cytochromu po doprowadzeniu do pH 7,4 nie używając polecanego przez Nielsena i Lehningera uprzedniego zakwaszania i wysycania powietrzem. Cytochrom taki wykazywał ponad 90% formy utlenionej.

DPNH uzyskiwano przez enzymatyczną redukcję DPN przy użyciu dehydrogenazy alkoholowej i etanolu.

Wszystkie używane odczynniki pochodziły z F-my Sigma i Fluka. Używano wyłącznie wody podwójnie destylowanej ze szklanego aparatu.

WYNIKI DOŚWIADCZALNE

Preparaty frakcji cząstkowych

Przy preparowaniu frakcji cząstkowych tkanek uzyskiwano osady w dolnych warstwach zielonkawe (ok. 1/10 obj. osadu), w górnych bezbarwne. Zielone zabarwienie posiadały również warstwy osadów po pierwszym wirowaniu (1000 x g).

Preparaty oglądane pod mikroskopem były jednorodne i zawierały cząstki kształtu sferycznego, wielkości rzędu 0,5 — 1,5 μ . Według definicji podanej przez Hacketta (1955) cząstki takie można uważać za mito-

chondria i w dalszym ciągu pracy używać będziemy terminu: preparaty mitochondrialne. Mitochondria stanowiły główny składnik tych preparatów, jakkolwiek częściowe zielonkawe zabarwienie wskazywało

Tabela 1 — Table 1

Wydajność frakcji mitochondrialnych poszczególnych tkanek wyrażona w mg białka preparatu na 1 g świeżej masy tkanki

The yield of mitochondrial protein (in mg) from 1 g wet weight of the tissue

Tkanka: Tissue:	<i>Opuntia monacantha</i>	<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	<i>Scorzonera hispanica</i>	<i>Daucus carota</i>
Preparat I	0,32	0,26	0,60	0,41
Preparat II	0,32		0,50	0,49
Średnia Average	0,32		0,55	0,45

na zawartość w nich również fragmentów chloroplastów. Wydajność frakcji mitochondrialnych poszczególnych tkanek przedstawia tabela 1.

Własności enzymów

Oksydaza cytochromowa w badanych tkankach wykazuje aktywność wyrażającą się wartościami od 25 do 130 $\mu\text{M} \times 10^{-2}$ cyt. c utlen./ 2 min/mg białka preparatu. Oksydaza ta jest we wszystkich preparatach hamowana w 97—100% przez KCN 10^{-3} M. Przebieg reakcji jest początkowo liniowy (do ok. 2/3 utlenienia cytochromu), a następnie hyperboliczny i doprowadza do całkowitego utlenienia cytochromu (ryc. 2).

Zwiększenie wartości osmotycznej w kiuwecie pomiarowej o 0,16 osmM przez dodanie odpowiedniej ilości sacharozy hamuje aktywność oksydazy w tkance *Sh* o ok. 65%.

Systematycznych badań nad trwałością enzymu w czasie nie prowadzono, natomiast sporadyczne pomiary aktywności preparatów przechowywanych w 0°C do 24 godzin wykazały znaczną aktywację oksydazy na odcinku 1—5 godzin od czasu zrobienia preparatu, sięgając 15—30% wartości początkowej dla różnych preparatów *Dc* i *Sh*. Po 20 godzinach aktywność stale jeszcze wynosiła ponad 60% aktywności maksymalnej.

DPNH — reduktaza i bursztyno-reduktaza cytochromu c. Reakcje redukcji cytochromu c przebiegają prawie do końca

Ryc. 2. Kinytyka reakcji oksydazy cytochromowej preparatu mitochondrialnego tkanki *Scorzonera hispanica*. Ilość preparatu odpowiada 20 μg białka

The kinetics of cytochrome c oxidase reaction in mitochondrial preparation from *Scorzonera hispanica* tissue. The quantity of preparation is equivalent with 20 μg of protein

Ryc. 3. Kinytyka reakcji DPNH-cytochromo c reduktazy preparatu mitochondrialnego tkanki *Scorzonera hispanica*: I — z dodatkiem KCN w kiuwecie pomiarowej; II — bez KCN. Ilość preparatu odpowiada 20 μg białka

The kinetics of DPNH-cytochrome c reductase in mitochondrial preparation from *Scorzonera hispanica* tissue: I — with KCN added; II — without KCN. The quantity of preparation is equivalent with 20 μg of protein

liniowo (ryc. 3 i 4) doprowadzając do ok. 95% redukcji cytochromu. Opuszczenie KCN przy pomiarze DPNH-reduktazy prowadzi do ustalenia się po kilku minutach równowagi między działaniem tego enzymu

Ryc. 4. Kinetyka reakcji bursztynno-cytochromu c reduktazy preparatu mitochondrialnego tkanki *Scorzonera hispanica*: I — z dodatkiem KCN w kiuwecie pomiarowej; II — bez KCN; III — reakcja reduktazy cytochromu c bez dodatku substratu.

Ilość preparatu odpowiada 40 μ g białka

The kinetics of succino-cytochrome c reductase in mitochondrial preparation from *Scorzonera hispanica* tissue: I — with KCN added; II — without KCN; III — autogene reduction of cytochrome c. The quantity of preparation is equivalent with 40 μ g of protein

i oksydazy cytochromowej. Poziom tej równowagi orientuje w proporcji aktywności obu enzymów i jest zazwyczaj zgodny z pomiarami aktywności tych enzymów oznaczanych oddzielnie.

Reduktaza bursztynowa cytochromu c wykazuje w pewnych przypadkach (*Dc*, *Sh*) po kilku minutach aktywację sięgającą 50—100% wartości początkowej (ryc. 4).

Reduktaza cytochromu c bez podanego substratu (ryc. 4) wykazuje aktywność bardzo małą, poniżej $0,5 \mu\text{M} \times 10^{-2}$ cyt. c/2 min/mg białka, przeważnie wynosi 0, nie było więc konieczności korygowania o tę wartość aktywności obu reduktaz.

Zgodność pomiarów 2 równoległych prób wszystkich enzymów była całkowita. Również dwukrotne rozcieńczenie preparatu dało w efekcie zupełną zgodność pomiarów aktywności oksydazy cytochromowej wykonanych w odstępie 5 minut.

Porównanie aktywności enzymów w różnych tkankach

Tabela 2 przedstawia wyniki z dwóch niezależnych doświadczeń przeprowadzonych na tkankach 6—7-tygodniowych, hodowanych w czerwcu i lipcu. Temperatura przy pomiarach spektrofotometrycznych wynosiła 27°C. Z uwagi na wspomniany już silny wpływ wartości osmotycznej w kiuwecie pomiarowej na aktywność oksydazy cytochromowej (znany składniad również dla DPNH-reduktazy cyt. c. (Kasprzakowa i in. 1960)), w doświadczeniach tych zachowano jednakową wartość osmotyczną przy pomiarach wszystkich enzymów przez dodanie KCl dla oksydazy

Tabela 2 — Table 2

Aktywności enzymów oddechowych w preparatach mitochondrialnych tkanek 6—7 tygodniowych, wyrażone w $\mu\text{M} \times 10^{-2}$ cyt. c utlenionego lub zredukowanego /2 min/ mg białka preparatu

Aktywność oksydazy cytochromowej oznaczona dla wszystkich preparatów dwukrotnie w czasie 40—60 minut od chwili przygotowania preparatu, DPNH-cytochromo c reduktazy w czasie 60—90 min., bursztyno-cytochromo c reduktazy w czasie 90—140 min. Skład kiuwet standardowy.

Przy pomiarach DPNH-cyt. c reduktazy i oksydazy cytochromowej dodano KCl dla uzyskania izotonii z roztworem przy pomiarze bursztyno-cytochromo c reduktazy. Wyniki z dwóch niezależnych eksperymentów

The activity of respiratory enzymes in mitochondrial preparations from tissues 6—7 weeks of age (since the last transfer). The activity expressed in $\mu\text{M} \times 10^{-2}$ of the reduced or oxidised cytochrome c in 2 minutes by 1 mg of the mitochondrial protein

The activity has been estimated in following time after preparations completed: cytochrome c oxidase 40—60 min, DPNH-cyt. c red. 60—90 min, succino-cyt. c red. 90—140 min. Temp. 27°C. To reach the osmotic value of the succino-cytochrome c reductase medium, KCl was added to the other media

Tkanka Tissue	g Wyjściowa ilość tkanki Starting amount of tissue g	Końcowa objętość preparatu ml Final volume of mito- chondrial prepara- tion ml	g tkanki w 1 ml preparatu Tissue in g per 1 ml of prepara- tion	mg białka w 1 ml preparatu Protein in mg per 1 ml of prepara- tion	Oksydaza cyt. c Cyt. c oxidase	DPNH- cyt. c red. DPNH- cyt. c red.	Burszt.- cyt. c red. Succ.- cyt. c red.
<i>Opuntia mona-</i> <i>cantha</i>	7	1,5	4,67	1,50	28,7	38,0	5,3
	7	1,5	4,67	1,50	21,6	32,6	4,7
<i>Scorzonera</i> <i>hispanica</i>	7	1,7	4,11	2,35	70,8	24,2	21,2
	7	3,5	2,00	1,00	113,0	30,0	35,0
<i>Parthenocissus</i> <i>tricuspidata</i>	5,5	1,0	5,50	1,45	60,0	73,9	9,0
<i>Daucus carota</i>	7	1,8	3,9	1,60	52,3	71,8	15,6
	5,5	1,5	3,8	1,80	70,0	82,2	10,5

cytochromowej i DPNH-reduktazy do wyrównania z wartością osmotyczną w kiuwetach dla bursztyno-reduktazy cyt. c (0,13 osmM).

Z tabel 2 i 3 (którą sporządzono dla przejrzystszego przedstawienia wyników zebranych w tabeli 2) wyprowadzić można ogólną charakterystykę badanych tkanek pod względem aktywności omawianych enzymów. Tkanki *Pt* i *Dc* wykazują bardzo zbliżony układ aktywności enzymów. Ich wspólną cechą jest wysoka aktywność DPNH-reduktazy cyt. c, nieco niższa od niej aktywność oksydazy oraz niska aktywność bursztyno-reduktazy cyt. c. Równowaga między oksydazą i DPNH-reduktazą ustala się w kiuwetach pomiarowych bez dodatku KCN już po 4 minutach, na poziomie ok. 50% zredukowanego cytochromu. Pozostaje to w przybliżeniu w zgodności ze stosunkiem aktywności oksydazy i DPNH-reduktazy w tych tkankach.

Tabela 3 — Table 3

Przeciętne wartości aktywności enzymów oddechowych w preparatach mitochondrialnych z 6—7 tygodniowych tkanek, wyrażone w $\mu\text{M} \times 10^{-2}$ cyt. c /2 min/ mg białka
The average activity of respiratory enzymes of mitochondrial preparations from several tissues 6—7 weeks of age (since the last transfer). Activity expressed in $\mu\text{M} \times 10^{-2}$ cyt. c reduced or oxidised in 2 min by 1 mg of mitochondrial protein

Tkanka Tissue	Oksydaza cyt. c Cytochrome c oxidase	DPNH-cyt. c reduktaza DPNH-cyt. c reductase	Bursztyno- cyt. c reduktaza Succino- cyt. c reductase	DPNH-cyt. c reduk- taza — KCN	
				równowaga red/ox cyt. c (% zred. cyt. c) steady state of cyt. c ox/red (in % of reduced cyt. c)	po czasie min after the time in minutes
<i>Opuntia monacantha</i>	25	35	5	70	12
<i>Scorzonera hispanica</i>	92	27	28	20	15
<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	60	74	9	43	4
<i>Daucus carota</i>	61	75	13	50	4

Odrębny typ przedstawia tkanka *Sh*, w której aktywność oksydazy cytochromowej, najsilniejsza ze wszystkich badanych tkanek, 3,5 razy przewyższa aktywność DPNH-reduktazy, która w tej tkance jest wyjątkowo słaba. Natomiast reduktaza bursztynowa cyt. c jest tu 2—4 razy silniejsza niż w pozostałych tkankach i dorównuje aktywności DPNH-

Tabela 4 — Table 4

Proporcje pomiędzy aktywnościami enzymów oddechowych. Wartości wyrażające aktywność DPNH-cytochromo c reduktazy przyjęto dla każdej tkanki za jednostkę

Proportional activity of respiratory enzymes in tissues 6—7 weeks of age (since the last transfer). The DPNH-cyt. c reductase activity taken as the unit

Tkanka Tissue	Oksydaza cytochromowa Cytochrome c oxidase	DPNH-cyt. c reduktaza DPNH-cyt. c reductase	Bursztyno-cyt. c reduktaza succino-cyt. c reductase
<i>Opuntia monacantha</i>	0,7	1	0,14
<i>Scorzonera hispanica</i>	3,4	1	1
<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	0,8	1	0,12
<i>Daucus carota</i>	0,8	1	0,17

Tabela 5 — Table 5

Aktywność enzymów: oksydazy cytochromowej, DPNH-cytochromo c reduktazy i bursztyno-cytochromo c reduktazy wyrażona w $\mu\text{M} \times 10^{-2}$ cyt. c /2 min/ mg białka. Tkanki liczące 9—10 tygodni od daty przeszczepienia. Stężenia w kiuwetach pomiarowych: dla oksydazy 0,15 osmM, dla DPNH-reduktazy 0,19 osmM, dla bursztyno-reduktazy 0,13 osmM

The activity of respiratory enzymes in mitochondrial preparations from tissues 9—10 weeks of age (since the last transfer). The activity expressed in $\mu\text{M} \times 10^{-2}$ cyt. c /2 min/ mg of mitochondrial protein. The osmolar concentration in reaction medium: cyt. c oxidase — 0,15 osmM, DPNH-cyt. c reductase — 0,19 osmM, succino-cyt. c reductase 0,13 osmM

Tkanka Tissue	Wyjściowa ilość tkanki g Starting amount of tissue g	Końcowa objętość preparatu ml Final volume of preparation ml	mg białka w 1 ml prepar. Protein in mg per 1 ml of preparation	Oksydaza cyt. c Cytochrome c oxidase	DPNH- cyt. c redukt. DPNH- cyt. c reduct.	Burszt.- cyt. c redukt. Succino- cyt. c reduct.
<i>Opuntia monacantha</i>	6	0,8	1,30	23,2	30,0	8,8
<i>Scorzonera hispanica</i>	6	0,8	2,5	53,6	35,6	18,4
	6	0,8	1,94	58,4	37,3	20,6
<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	6	0,8	0,61	64,3	88,4	13,2
<i>Daucus carota</i>	6	0,8	2,2	58,0	78,0	9,5

reduktazy cyt. c. Wybitna przewaga aktywności oksydazy cytochromowej w preparacie z tkanki *Sh* znajduje odbicie w bardzo silnym załamowaniu aktywności DPNH-red. wobec braku cyjanku w kiuwecie pomiarowej. Równowaga red-ox cytochromu c ustala się w tych warunkach 4 razy później niż w przypadku tkanek *Dc* i *Pt* i to na poziomie tylko 20% zredukowanego cyt. c. Tkanka *Om* wykazuje najsłabszą spośród badanych tkanek aktywność enzymów, przy czym najsilniejsza jest DPNH-reduktaza cytochromu c. Znajduje to swoje odbicie w ustaleniu się równowagi między oksydazą i DPNH-reduktazą po 12 minutach na poziomie 70% zredukowanego cytochromu. Proporcje badanych enzymów w poszczególnych tkankach uwidacznia tabela 4. Wynika z niej duża zgodność proporcji aktywności badanych enzymów w tkankach *Pt* i *Dc*. Zarazem uwidacznia się ta sama proporcja dla tkanki *Om*, tak że różnicą między *Om* a *Pt* i *Dc* jest ogólnie niższą aktywność enzymów tej tkanki. W tkance *Sh* proporcje między enzymami są wybitnie różne.

Tabela 6 — Table 6

Przybliżone proporcje pomiędzy aktywnościami enzymów: oksydazy cyt., DPNH-cytochromo c reduktazy i bursztyno-cytochromo c reduktazy w tkankach 9—10 tygodniowych, obliczone na podstawie danych z tabeli 5. Wartości dla DPNH-cyt. c reduktazy przyjęto dla każdej tkanki za jednostkę

Proportional activity of respiratory enzymes in preparations from tissues 9—10 weeks of age, calculated with DPNH-cyt. c reductase activity as a unit

Tkanka Tissue	Oksydaza cytochromu c Cytochrome c oxidase	DPNH-cytochromo c reduktaza DPNH-cytochrome c reductase	Bursztyno-cytochromo c reduktaza Succino-cytochrome c reductase
<i>Opuntia monacantha</i>	0,8	1	0,3
<i>Scorzonera hispanica</i>	1,6	1	0,6
<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	0,7	1	0,1
<i>Daucus carota</i>	0,7	1	0,1

Dla porównania z opisanymi doświadczeniami przytaczamy poniżej (tabela 5 i 6) wyniki wcześniejsze, uzyskane na tkankach liczących 9—10 tygodni i mających około 2 razy większą masę oraz przy nieco innym stężeniu ostatecznym w kiuwetach pomiarowych, a mianowicie:

dla oksydazy cytochrom. 0,15 osmM zamiast 0,13

dla DPNH-red. cytochrom. 0,19 osmM zamiast 0,13

dla bursztyno-red. cytochrom. 0,13

Tabela 6 podaje przybliżone proporcje pomiędzy aktywnościami poszczególnych enzymów przy przyjęciu wartości DPNH-red. za jednostkę dla każdej tkanki.

Z tabel 5 i 6 wynika znaczna zgodność — zarówno bezwzględnych, jak i względnych wartości aktywności poszczególnych enzymów — z wynikami serii głównej (tab. 2—4) dotyczącymi tkanek *Pt*, *Dc* i *Om*.

Tkanka *Sh* natomiast charakteryzuje się znacznym spadkiem aktywności oksydazy cytochromowej, przy równoczesnym wzroście aktywności DPNH-cytochromo c reduktazy. Różnica w wartościach osmotycznych przy pomiarach oksydazy i DPNH-reduktazy cytochromu c, w stosunku do doświadczeń zebranych w tabelach 2—4, idzie w kierunku zwiększenia aktywności oksydazy cytochromowej. Tak więc przesunięcie proporcji aktywności tych enzymów w tkance *Sh* istotnie zachodzi.

DYSKUSJA

Preparaty frakcji cząstkowych (mitochondrialnych) wszystkich badanych tkanek wykazują zdolność zarówno utleniania, jak i redukcji cytochromu c przy użyciu takich substratów, jak bursztynian i DPNH, co wskazuje na obecność w tych tkankach cytochromowego układu oddechowego. Z wykresów (ryc. 2—4) ilustrujących przykładowo dla tkanki *Sh* przebieg redukcji i utlenienia cytochromu c (dla pozostałych tkanek wykresy te przedstawiają się podobnie) wynika, że reakcja oksydazy cytochromowej jest w znacznej części swego przebiegu reakcją I rzędu, co zgadza się ze znanymi własnościami tego enzymu (Smith, Conrad 1956). Cyjanek w stężeniu 10^{-3} M hamuje reakcję w 97—100%.

Interesujące jest zachowanie się bursztyno-cytochromo c reduktazy w początkowym okresie przebiegu reakcji, wskazujące na jej stopniową aktywację. Zjawisko to obserwował również Hackett (1956) w preparatach mitochondrialnych tkanki bulwy ziemniaka, tłumacząc je powolnym przenikaniem bursztynianu przez błony mitochondrialne. Zjawisko to nie zachodzi w przypadku reakcji DPNH-cytochromo c reduktazy, której przebieg jest liniowy począwszy od 20 sekundy od chwili podania preparatu.

Brak autogennej redukcji cytochromu c wskazuje na dokładne usunięcie substratów w toku preparacji frakcji cząstkowych. Pomimo, że w składzie kiuwet pomiarowych specjalnie zadbano o identyczne stężenia przy pomiarach wszystkich trzech enzymów (przez dodawanie odpowiednich ilości KCl) — trudno jest wnioskować o takiej samej proporcji między badanymi enzymami w tkance *in vivo*, chociażby z uwagi na na

pewno нефизјологічне стężеніе цытохромu c і DPNH. Усталеніе тей рўннoвaгi бyлo трудне нaвeт в вaрункaх пoмiaрў з увагi нa силнa aктывaцję oксыдaзы цытохромoвeй в пiерwсьчх гoдзiнaх пo спoрзaдзeнiу пpeпapaтy, сięгaжaцa 15—30% вaртości пoчaткoвeй. Длa уникнiцiа рўзниц мoгaцьх вьинкнaц з тей aктывaцji, пoмiaры aктывнości пoсщeгўлньчх eнзымў длa вщысткiх ткaнeк пpeпpoвaдзoнo в oкpeслeньчх oдстęпaх чaсy oд чwили зрoблeнiя пpeпapaтy.

Пpeпpoвaдзaжaц oриeнтaцыйнe пoрўвнaнiя oтpьимaньчх вьинкў з дaньми з пpaц iнньчх aтoрў вiдзимь, жe aктывнość oксыдaзы цытохромoвeй в бaдaньчх ткaнaкaх жeст oд кiлкy дo кiлкунaстy рaзы вьщсзa нiж знaлeзoнa пpeз H a c k e t t a (1956) в мiтoчoндpиaх зieмнiaкa. Жeст oнa нaтoмiaст нiжсzа (гдь пpeлiчымь нa μl $\text{O}_2/\text{гoдз}/\text{г}$ щв. мaсь тkaнкi) oд знaйдoвaнeй в кiлкaх пщeниць, jęцзмieнiя i гpoчy пpeз F r i t z a i B e e v e r s a (1955), гдзe сięгa рзeдy 1000 μl $\text{O}_2/\text{гoдз}/\text{г}$ щв. мaсь, чь пpeз H o n d a (1957) в кoрeнiaх jęцзмieнiя.

Co сię тьчь пpoпoрцji мięдзь тpьмa бaдaньми eнзымaми нaлęжь ствeрдзicь, жe стoсyнeк oксыдaзы цьт. /DPNH-цьт. c. рeдyктaзы жeст з вьjaткiем тkaнкi *Sh* ниски (пoнижeй 1) в пoрўвнaнiу з мiтoчoндpиaми зieмнiaкa (H a c k e t t 1956) чь зaрoдкў пщeниць (J o h n s t o n, N a s a t i r, S t e r n 1957), гдзe вьнoсi oн 3,5—4. Стoсyнeк DPNH-цьт. c. рeдyктaзы/ бypщтьнo-цьт. c. рeдyктaзы в бaдaнiaх ткaнaкaх жeст нaтoмiaст вьсoкi i вьнoсi 6—7 (y зieмнiaкa 2) з вьjaткiем тkaнкi *Sh*, гдзe жeст зблiжўнo дo 1. Тpьбa ствeрдзicь, жe тkaнкa *Sh* знaчнie oдбeгa пoд вьглeдeм пpoпoрцji eнзымў oд пoзoстaльчх, бaдaньчх ткaнeк. Тkaнкa *Om* чaрaктeрьизyжe сię oгўлнie нискими вaртoścиaми aктывнości eнзымў, co пoкpьвa сię з жeй стoсyнкoвo ниским зaпoтpьбeвaнieм тлeнoвьм (M i c h e j d a 1960).

Жeжeлi пoрўвнaмь aктывнości oксыдaзы цытохромoвeй пoсщeгўлньчх ткaнeк в пpeлiчeнiу нa μl $\text{O}_2/\text{гoдз}/\text{г}$ щв. мaсь тkaнкi з iч зaпoтpьбeвaнieм тлeнoвьм (M i c h e j d a Чз. I, 1960), co пpeдстaвiя тaбeлa 7, ствeрдзaмь пeвнe нeдoбўр oксыдaзы.

Нaлęжь jеднaк вziaць пoд вьвaгę, жe нeдoбўр oксыдaзы цытохромoвeй мoжe бьц вьвoлaнь тьм, жe в чaсiе пpeпapaвaнiя фpaкцiя чaсткoвa нe жeст вьизoлoвьвaнa в спoсўб iлoścиoвь. H o n d a (1957) ствeрдзiл нa пpьклaд знaчнa aктывнość oксыдaзы цытохромoвeй вe фpaкцji бiлўн кoмўркoвьчх спoвoдoвaнa зaнeчьщзщeнiaми чaсткoвьми.

Дpьгa пpьчьинa oбнiжeнiя aктывнości oксыдaзы цытохромoвeй мoжe бьц ўжьтe стężeнiе цытохромu c, ктўрe вг S m i t h i C o n r a d (1956) хaмyжe aктывнość oксыдaзы. Тaк вięc oдпoвeдз нa пьтaнiе, чь oксыдaзa цытохромoвa жeст jедьнa oксыдaзa кoнцoвa чьиннa в пpoцeсiе oддьчaнiя бaдaньчх ткaнeк — вьмaгa дaлщьчх бaдaнь.

Tabela 7 — Table 7

Porównanie aktywności oksydazy cytochromowej, wyrażonej w $\mu\text{l O}_2/\text{godz.}/\text{g}$ św. preparatu mitoch. z 1 g św. masy tkanki, z zapotrzebowaniem tlenowym skrawków tkanek

Comparison of the cytochrome c oxidase activity expressed in $\mu\text{l O}_2/\text{hour}/\text{g}$ fresh weight of the tissue with the oxygen uptake of the tissue slices

Tkanka	$\text{QO}_2 \mu\text{l O}_2/\text{godz.}/\text{g}$ św. masy tkanki (skrawki)	Aktywność oksydazy cytochromowej $\mu\text{l O}_2/\text{godz.}/\text{g}$ św. masy (Preparat mitochondr.)	% pokrycia zapotrzebowania tlenowego przez oksydazę cytochromową
Tissue	$\text{QO}_2 \mu\text{l O}_2/\text{h}/\text{g}$ of wet weight of the tissue slices	Cytochrome c oxidase $\mu\text{l O}_2/\text{h}/\text{g}$ of wet weight (mitochondrial preparations)	The % of total oxygen uptake of the tissue that can be accounted for by cytochrome c oxidase
<i>Scorzonera hispanica</i>	50	85	170
<i>Daucus carota</i>	50	46	92
<i>Parthenocissus tricuspidata</i>	35	26	74
<i>Opuntia monacantha</i>	20	13	65

Dalszego opracowania wymaga również obserwacja nad zmniejszeniem aktywności oksydazy cytochromowej w tkance *Sh* 10-tygodniowej w stosunku do 6-tygodniowej (od daty przeszczepienia) — w jakim stopniu jest to związane z wiekiem tkanki, a w jakim z prawdopodobnym niedoborem pożywki na skutek przerastania tkanki, która odznacza się w stosunku do pozostałych intensywnym wzrostem.

ZESTAWIENIE WYNIKÓW

1. Preparaty frakcji cząstkowych (mitochondrialnych) uzyskane z kilku tkanek roślinnych hodowanych *in vitro* wykazują zdolność utleniania cytochromu c oraz jego redukcji przy użyciu DPNH i bursztynianu jako substratów.

2. Aktywność oksydazy cytochromowej w badanych tkankach wyraża się wartościami od $25\text{--}130 \mu\text{M} \times 10^{-2}$ cyt. c/2 min/mg białka preparatu. Reakcja w warunkach pomiaru przebiega liniowo przez pierwsze 2 minuty. Aktywność oksydazy jest silnie zależna od wartości osmotycz-

nej. W okresie 1—5 godzin po zrobieniu preparatu następuje zwiększenie aktywności o 15—30% wartości początkowej.

3. Reakcje reduktaz cytochromu c przebiegają prawie do końca liniowo i doprowadzają do redukcji ok. 95% cytochromu.

Pominięcie KCN przy pomiarze DPNH-reduktazy cyt. c prowadzi do ustalenia się równowagi red/ox cytochromu c, której poziom odpowiada stosunkowi aktywności oksydazy i reduktazy cytochromu w danym preparacie mierzonych oddzielnie.

Bursztyno-cytochromo c reduktaza wykazuje w preparatach tkanek Dc i Sh po kilku minutach aktywację sięgającą 50—100% wartości początkowej.

Autogennej redukcji cytochromu c w badanych preparatach nie stwierdzono.

4. Spośród badanych tkanek Pt i Dc wykazują zbliżone wartości bezwzględne oraz proporcje pomiędzy aktywnościami poszczególnych enzymów. Tkanka Sh (6-tygodniowa) odznacza się wybitnie wysoką aktywnością oksydazy cytochromowej. Tkanka Om wykazuje najniższe aktywności wszystkich enzymów spośród badanych tkanek.

Katedra Fizjologii Roślin
i Zakład Fizjologii Zwierząt
Uniwersytetu im. A. Mickiewicza
w Poznaniu

(Wpłynęło dn. 30.5. 1960)

SUMMARY

Introduction

Continuing the researches on terminal oxidases in several plant tissues cultivated *in vitro* (Michejda 1960) — the spectrophotometric investigations of the enzymes connected with oxidation and reduction of cytochrome c in particulate fraction preparations of the tissues were carried on.

Material and methods

Four tissues were used for the investigations:

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

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

Particulate fraction preparations and the protein estimation in them were done according to the methods described in Part I. (Michejda 1960). Spectrophotometric measurements of the activity of cytochrome c oxidase, DPNH-cytochrome c reductase and succino-cytochrome c reductase were done using Hilger Spectrophotometer H-700, in 1 cm glass cuvettes, at 24° or 27°C. The total volume of the liquid in cuvettes was 1 ml. All enzymes were examined in 0,025 M phosphate buffer (Na/K), pH 7,0, and by the cytochrome c concentration (reduced or oxidized) $2,6 \times 10^{-5}$ M.

In DPNH-cyt. c reductase measurements DPNH in concentration 10^{-4} M and KCN 10^{-3} M were added. In case of succino-cyt. c reductase DPNH was replaced by sodium succinate in concentration of 0,01 M. To keep the isotonic concentration with succino-cyt. c reductase medium, KCl was added to other reaction media. In control cuvettes only cytochrome c was omitted. The total content of cytochrome c in cuvettes was estimated after measurements using $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ as reductor. The extinction changes were measured every 10 second in case of cytochrome c oxidase, and every 15 second in case of both reductases.

Enzyme activities were expressed in $\mu\text{M} \times 10^{-2}$ of the reduced or oxidized cytochrome c during 2 minutes by 1 mg of the particulate fraction protein. The values: $\alpha \text{ cyt}_{\text{ox}} = 0,090 \times 10^2 \text{ cm}^2/\mu\text{M}$ $\alpha \text{ cyt}_{\text{red}} = 0,281 \times 10^2 \text{ cm}^2/\mu\text{M}$ were assumed as molar extinction coefficients. Cytochrome c was prepared using Keilin's method (1952) and was used as the oxidized form. Cytochrome was reduced by Nielsen and Lehninger's method (1955) and the high reduction degree ($-\frac{E_{550}}{E_{565}} = 12 - 14$) was achieved. We got the DPNH by the enzymatic reduction of DPN. Fluka and Sigma reagents and bidistillated water from glass apparatus were exclusively used.

Results and discussion

The yield of particulate fraction preparation expressed in mg. of protein/ per 1 g of fresh tissue mass (Table 1) was very reproducible for separate tissues. The preparations contained spherical particles ranging from 0.5 — 1,5 μ . These particles may be regarded as mitochondria (Hackett 1955) so the term "mitochondrial preparations" is also used

in the present work. Concerning the kinetics of the reaction it has been found the cytochrome c oxidase reaction in the greater part of its course to be the first order's one, and leading to the complete oxidation of cytochrome. It was completely inhibited by KCN 10^{-3} M. Both reductases ran nearly to the end as the O-order reactions, causing the reduction of cytochrome in about 95%.

The omission of KCN during the determination of DPNH-cyt. c reductase inhibited the reaction and caused the stabilisation of red/ox cytochrome c on the level approximately concordant with the proportion of reductase and the oxidase of cytochrome. Succino-cytochrome c reductase in tissues of *Daucus* and *Scorzonera* shows the activation in several minutes after preparation completed. No autogene reduction of cytochrome was found in the preparations.

The cytochrome c oxidase activity largely depends on the osmotic value in cuvettes. It decreases by half at the concentration difference 0,16 osM. The observation upon the durability of this enzyme in preparations from *Daucus* and *Scorzonera* tissues showed strong activation of cytochrome oxidase 1—5 hours after making the preparation. This activation is probably caused by the mitochondrial changes in a slightly hypotonic medium. The general characteristic of the investigated tissues can be drawn from Table 3. The tissues of *Daucus* and *Parthenocissus* are very similar ones. They have rather high DPNH-cyt. c reductase and very low succino-cyt. c reductase activity. The balance between the oxidase and reductase is fixed on the level about 50% of the reduced cytochrome c when KCN is omitted. The absolute values for both tissues are also very similar.

Scorzonera tissue in which the cytochrome oxidase activity is 3 times higher than that of DPNH-cyt. c reductase, the latter being in this tissue exceptionally low, represents a different type. Succino-cyt. c reductase is 2—4 times stronger than in other tissues and nearly equal to DPNH-cyt. c reductase. The prevalence of cytochrome c oxidase over DPNH-cyt. c reductase in *Scorzonera* tissue is visible in the strong inhibition of the latter when KCN is omitted. The balance in this case is reached more slowly, on the low level (20%) of reduced cytochrome. *Opuntia* tissue shows the lowest activity of all enzymes among the all investigated tissues, DPNH-cyt. c reductase being the strongest. In connection with it — the red/ox balance is fixed when KCN is omitted on the level of about 70% reduced cytochrome c. The proportions of the activities of enzymes (by taking DPNH-cyt. c reductase activity in the given tissue as the unit) are shown in Table 4.

A similar comparison of the older tissues (Table 6) showed nearly the same enzyme proportions for all the tissues except *Scorzonera* in which

cytochrome c oxidase was only 1,6 times more active than DPNH-cyt. c reductase. It may be connected with the age of tissue, or with the deficiency of nutrient caused by its excessive growth.

Comparing our results with the data of other authors, one can see that cytochrome c oxidase activity is several, up to twenty times higher than in potato mitochondria (Hackett 1956), it is on the other hand lower than in wheat and barley seedlings (Fritz, Beevers 1955) or in barley roots. The ratio: cyt. c oxidase/DPNH-cyt. c reductase is lower (except in *Scorzonera*) than in potato (Hackett 1956) or embryos (Fritz, Beevers 1955). The ratio: DPNH-cyt. c reductase/ succino-cyt. c reductase is higher than in potato mitochondria (except *Scorzonera* tissue).

The comparison of the cytochrome c oxidase activity expressed in $\mu\text{l O}_2/\text{h/g}$ of fresh tissue mass with the oxygen uptake of the tissue slices (Michejda 1960) shows some deficiency (except *Scorzonera* tissue) of the cytochrome oxidase activity. It may be caused however by the inhibiting action of cytochrome c in concentration used (Smith, Conrad 1956) or by loss of mitochondrial fraction in the course of preparation, and it does not allow to draw a conclusion on the participation of other oxidases in respiration of investigated tissues.

LITERATURA

- Fritz G., Beevers H., 1955, Cytochrome oxidase content and respiratory rates of etiolated wheat and barley seedlings *Plant Physiol.* 30: 309.
- Gautheret R. J., 1954, Catalogue des cultures de tissus végétaux, *Rev. Gén. Bot.* 61: 672.
- Gentile A. C., Naylor A. W., 1955, The metabolism of *Rumex* virus tumors. Terminal respiratory enzymes, *Physiologia Plant.* 8: 682.
- Hackett D. P., 1955, Recent studies on plant mitochondria, *Int. Rev. Cytol.* 4: 143.
- Hackett D. P., 1956, Pathways of oxidations in cell free potato fractions, *Plant Physiol.* 31: 111.
- Heller R., 1952 Recherches sur la nutrition minérale de tissus végétaux cultivés *in vitro*, Thèse, Paris, 223 pp.
- Honda S. I., 1957, Some effects of ascorbic acid and metal complexing agents on the respiration of barley roots, *Plant Physiol.* 32: 23.
- Johnston F. B., Nasatir M., Stern H., 1957, The isolation of nuclei and oxidative particles from viable wheat embryos, *Plant Physiol.* 32: 124.
- Kasprzakowa L., Obuchowicz L., Michejda J., Ogórkiewicz T., 1960, Enzymatyka oddychania u *Helix pomatia* L. II. Parametry aktywności enzymów odechowych, PTPN, Prace Kom. Biol. (w druku).
- Keilin D., Hartree E. F., 1952, *Biochemical Preparations* 2, 109 pp., New York, J. Wiley & Sons, Inc.

- Michejda J., 1960, Oksydazy końcowe tkanek roślinnych hodowanych *in vitro*. Cz. I. Działanie inhibitorów oddechowych. Oksydazy miedziowe. Acta Soc. Bot. Pol. 29 (4): 673.
- Nielsen S. O., Lehninger A. L., 1955, Phosphorylation complet to the oxidation of ferrocycytochrome c., J. Biol. Chem. 215: 555.
- Shappirio D. G., Williams C. M., 1957, The cytochrome system of the Cecropia silkworm. II. Spectrophotometric studies of oxidative enzyme systems in the wings epithelium, Proc. Roy. Soc. B. 147: 233.
- Smith L., 1955, Cytochrome c oxidase, Methods in Enzymology II, Colowick S. P., Kaplan N. O. 987 pp., Acad. Press, New York.
- Smith L., Conrad H. 1956, A study of the kinetics of the oxidation of cytochrome c by cytochrome c oxidase. Arch. Biochem. Biophys. 63: 403.
- Stern H. Johnston F. B., 1957, A particulate piridine nucleotide oxidase system of the wheat embryo, Plant Physiol. 32: 476.
- Umbreit W. W., Burris R. H. Stauffer I. F., 1957, Manometric techniques 338 pp. Burgess Publishing Co. Minneapolis.