

SZKOŁA GŁÓWNA GOSPODARSTWA WIEJSKIEGO

MARCIN MACIĄGA

ANALIZA ZYMOGRAMÓW  
AMINOTRANSFERAZY ASPARAGINIANOWEJ  
U TRAW Z RODZAJÓW *TRITICUM* I *AEGILOPS*

Praca magisterska  
Wykonana  
W Katedrze Biochemii SGGW  
Pod kierunkiem  
**Prof. dr hab. A. Paszkowskiego**

WARSZAWA 2002

*Panu Prof. dr hab. A. Paszkowskiemu  
składam serdeczne podziękowanie za  
cenne uwagi i rady udzielone w czasie  
wykonywania niniejszej pracy.*

<b>1. WSTĘP</b> .....	<b>3</b>
1.1. Reakcja katalizowana przez aminotransferazę asparaginianową (AAT).....	3
1.2. Izoenzymy AAT.....	3
1.3. Lokalizacja wewnątrzkomórkowa izoenzymów AAT .....	4
1.4. Funkcje metaboliczne AAT .....	4
1.5. Terminologia izoenzymów i sposób ich oznaczania na zymogramie .....	5
1.6. Badania genetyczne.....	6
<b>2. CEL PRACY</b> .....	<b>8</b>
<b>3. MATERIAŁ I METODY</b> .....	<b>9</b>
3.1. Materiał doświadczalny.....	9
3.2. Metody badawcze.....	9
3.2.1. Izolowanie chloroplastów .....	9
3.2.2. Izolowanie mitochondriów.....	9
3.2.3. Częściowe oczyszczanie cytoplazmy .....	10
3.2.4. Spektrofotometryczna metoda oznaczania aktywności aminotransferazy asparaginianowej (AAT) .....	10
3.2.5. Elektroforeza analityczna w 7.5% żelu poliakrylamidowym .....	11
3.2.6. Metoda pomiaru aktywności AAT w żelu poliakrylamidowym .....	12
3.2.6. Oznaczanie białka .....	13
<b>4. WYNIKI</b> .....	<b>14</b>
4.1. Badanie zależności między aktywnością AAT nanoszonego wyciągu a intensywnością zabarwienia chromoforu .....	14
4.2. Lokalizacja wewnątrzkomórkowa izoenzymów AAT .....	15
4.3. Obraz elektroforetyczny AAT u traw z rodzajów <i>Triticum</i> i <i>Aegilops</i> .....	16
4.4. Zastosowanie modelu matematycznego do określenia częstotliwości występowania podjednostek AAT w paśmie cytoplazmatycznym .....	18
4.4.1. Model matematyczny dla <i>T. durum</i> L. ....	19
4.4.2. Model matematyczny dla <i>T. aestivum</i> L. ....	20
<b>5. DYSKUSJA</b> .....	<b>21</b>
<b>6. WNIOSKI</b> .....	<b>26</b>
<b>7. STRESZCZENIE</b> .....	<b>27</b>
<b>8. LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA</b> .....	<b>28</b>

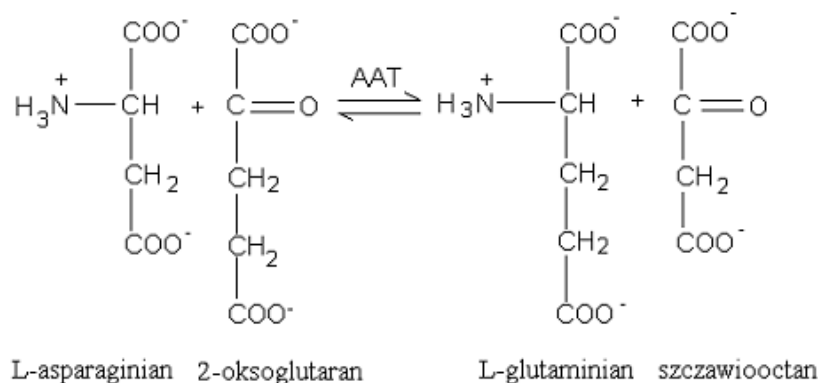
### **Wykaz stosowanych skrótów**

<b>AAT</b>	Aminotransferaza asparaginianowa (EC 2.6.1.1)
<b>BSA</b>	Albumina z surowicy wołowej
<b>EDTA</b>	Kwas etylenodiaminotetraoctowy
<b>PLP</b>	Fosforan pirydoksalu
<b>PVP</b>	Poliwinylopolipirrolidon
<b>MOPS</b>	Kwas 3-(N-morfolino) propanosulfonowy
<b>m-PMS</b>	N-metylofenazyno metasulfonian
<b>MTT</b>	3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl]-2,5-difenył tetrazolium bromidyny
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametylenoetylenodiamina
<b>Tris</b>	Tris (hydroksymetylo) aminometan

## 1. WSTĘP

### 1.1. Reakcja katalizowana przez aminotransferazę asparaginianową (AAT)

**A**minotransferaza asparaginianowa (AAT, EC 2.6.1.1) pełni ważne funkcje w metabolizmie komórkowym u wszystkich żywych organizmów. Enzym jest białkiem dimerycznym o masie cząsteczkowej około 100 kDa z kowalencyjnie przyłączoną cząsteczką fosforanu pirydoksalu (PLP) w centrum aktywnym. W reakcjach transaminacji katalizowanych przez AAT PLP służy jako pierwszy akceptor grupy aminowej (Givan 1980). Donorem tej grupy zwykle jest L-asparaginian lub L-glutaminian natomiast kolejnym po PLP akceptorem odpowiednio: 2-oksoglutaran lub szczawiooctan (rys. 1).



**Rysunek 1: Reakcja katalizowana przez AAT.**

### 1.2. Izoenzymy AAT

**U**zwierząt wykryto tylko dwa izoenzymy AAT, które zlokalizowano w cytoplazmie i mitochondriach (Palmisano i in. 1995). U roślin natomiast obserwowano ich znacznie więcej. I tak przypuszcza się, że 3 izoenzymy AAT występują w prosie (Taniguchi i in. 1995), u *Stephanomerii exigua* L. (Gottlieb 1973), w życie (Jaaska 1975), w pszenżycie (Hart i Tang 1975), w pszenicy i w *Aegilops* (Hart i in. 1976); 4 izoenzymy znaleziono w szpinaku (Huang i in. 1976) i w grochu (Weeden i Marx 1984) natomiast 5

w kukurydzy (Scandalios i in. 1975), w fasoli (Wadsworth i in. 1993) i u *Arabidopsis* (Schultz i in. 1998).

### 1.3. Lokalizacja wewnątrzkomórkowa izoenzymów AAT

Izoenzymy AAT lokalizowano w różnych przedziałach komórkowych. Występowanie izoenzymów AAT w cytoplazmie, mitochondriach, chloroplastach i peroksysomach stwierdzili Huang i in. (1976) w szpinaku i Schultz i in. (1998) w *Arabidopsis*. Z kolei Taniguchi i in. (1995) zlokalizował izoenzymy AAT z prosa w cytoplazmie, mitochondriach i plastydach. Natomiast u kukurydzy Scandalios i in. (1975) wykryli je w cytoplazmie, mitochondriach i glioksysomach.

W preparatach histochemicznych szarłatu (*Amaranthus hybridus* L.) rośliny typu C<sub>4</sub>, enzym obserwowano w mitochondriach, chloroplastach oraz w cytoplazmie komórek mezofilu i komórek pochwy okołowiązkowej a także w błonie mikrociałek (Rex 1987). Ponadto aminotransferaza asparaginianowa występowała w połączeniach między komórkami mezofilu i komórkami pochwy okołowiązkowej oraz w plazmodesmach między tymi ostatnimi a komórkami tkanki przewodzącej. Podczas barwienia na aktywność AAT najintensywniej barwiły się mitochondria a zwłaszcza matriks mitochondrialna. Z kolei w chloroplastach enzym znajdował się głównie na obrzeżach tych organelli.

### 1.4. Funkcje metaboliczne AAT

Reakcja katalizowana przez AAT stanowi główne źródło L-asparaginianu w komórkach. L-asparaginian to prekursor w biosyntezie metioniny i lizyny - aminokwasów niezbędnych do syntezy białek. Ponadto L-asparaginian jest związkiem wyjściowym w syntezie L-asparaginy i ureidów, które uczestniczą w transporcie związków azotowych (Schubert 1986).

AAT bierze udział w asymilacji azotu dostarczając substratu tj. 2-oksoglutaranu do cyklu syntetazy glutaminowej i syntazy glutaminianowej (tzw. cykl GS/GOGAT) (Taiz i Zeiger 1991).

AAT uczestniczy w międzykomórkowym transporcie metabolitów pomiędzy komórkami mezofilu a komórkami pochwy okołowiązkowej. Rośliny typu C<sub>4</sub> można podzielić na 3 typy głównie ze względu na enzym katalizujący uwolnienie CO<sub>2</sub> w

komórkach pochwy okołowiązkowej. W pierwszym typie roślin  $C_4$  w dekarboksylacji uczestniczy dekarboksylaza jabłczanowa  $NADP^+$  zależna, w drugim dekarboksylaza jabłczanowa  $NAD^+$  zależna a w trzecim karboksykinaza fosfoenolopirogranianowa. We wszystkich tych roślinach  $CO_2$  wbudowywany jest do czterowęglowych kwasów dikarboksylowych w komórkach mezofilu i transportowany do komórek pochwy okołowiązkowej gdzie po uwolnieniu w wyniku reakcji dekarboksylacji zostaje włączany do cyklu Calvina. W pierwszym typie roślin  $C_4$  główną formę przekaźnikową  $CO_2$  do komórek pochwy okołowiązkowej stanowi jabłczan natomiast w dwóch pozostałych L-asparaginian. A zatem sprawne funkcjonowanie szlaków transportu  $CO_2$  wymaga od AAT wysokiej aktywności w obydwu typach komórek roślin  $C_4$  (Burnell i Hatch 1988).

AAT uczestniczy w wewnątrzkomórkowym jabłczanowo–asparaginianowym systemie wahadłowym przenoszącym równoważniki redukcyjne w poprzek błony mitochondrialnej (Hanning i Heldt 1993), chloroplastowej (Heber 1974) czy peroksysomalnej (Tolbert i in. 1969). Czółenko jabłczanowo–asparaginianowe funkcjonuje również w brodawkach korzeniowych transportując równoważniki redukcyjne z komórek gospodarza do endofitu (Rastogi i Watson 1991).

Enzym odgrywa ważną rolę w reakcji transaminacji prowadzącej do usuwania azotu z aminokwasów i w ten sposób dostarczania ketokwasów do cyklu Krebsa (Voet i Voet 1995) oraz w transporcie szczawiooctanu (jako substratu glukoneogenezy) z mitochondriów do cytoplazmy (Voet i Voet 1995).

### 1.5. Terminologia izoenzymów i sposób ich oznaczania na zymogramie

Zgodnie z rekomendacją Komitetu Nomenklatury Biochemicznej (1976) termin **Z**izoenzym powinien być stosowany w odniesieniu do form enzymu zróżnicowanych genetycznie a zatem wykazujących różnice w strukturze pierwszorzędowej. Izoenzymy, które powstają z połączenia podjednostek kodowanych przez geny alleliczne nazywamy **alloenzymami**. Jako, że są one utworzone przez podjednostki o podobnej sekwencji aminokwasowej niewiele się różnią pod względem ruchliwości elektroforetycznej w żelu i na zymogramie (obraz rozmieszczenia aktywności enzymatycznej po elektroforezie) tworzą charakterystyczne (zazwyczaj dla określonej struktury subkomórkowej) ugrupowania nazywane **pasami enzymatycznymi**. Poszczególne pasma oznaczane są kolejnymi numerami zaczynając od tych o największej ruchliwości elektroforetycznej w kierunku anody (+) np. AAT-1, AAT-2 i AAT-3. Alloenzymom należącym do danego

pasma enzymatycznego przyporządkowuje się małe litery w kolejności zgodnej z malejącą ruchliwością elektroforetyczną np. AAT-1a, AAT-1b i AAT-1c.

Przy porównywaniu wyników dla różnych roślin należy zachować dużą ostrożność ponieważ na przykład pasmu enzymatycznemu AAT-1 z łubinu odpowiada izoenzym cytoplazmatyczny (Gregerson i in. 1994) natomiast u *Arabidopsis* i kukurydzy izoenzym mitochondrialny (Schultz i Corrucci 1995, Scandalios i in. 1975); z kolei u fasoli izoenzym glioksosomalny (Wadsworth i in. 1995).

## 1.6. Badania genetyczne

Większość genów u tetraploidalnej pszenicy (*Triticum durum* L.) o formule genetycznej AABB występuje podwójnie (związane jest to z obecnością dwóch różnych typów genomów) natomiast u heksaploidalnej pszenicy (*Triticum aestivum* L.) o formule AABBDD potrójnie. W związku z tym klasyczna mendłowska analiza genetyczna tych gatunków jest trudna. Z kolei ich poliploidalność sprawia, że stanowią bardzo dobry materiał doświadczalny do innych rodzajów badań genetycznych.

Występowanie tego samego typu genomu nawet u różnych gatunków o różnym stopniu ploidalności wskazuje na ich bliskie pokrewieństwo. Cechą wspólną dla *T. durum* L. i *T. aestivum* L. jest typ genomu A i B. Umożliwia to porównywanie wyników.

Najwięcej linii aneuploidalnych (rośliny ze zmodyfikowanymi chromosomami) wyprowadzono dla *T. aestivum* L. odmiany Chinese Spring. Linie aneuploidalne stosowano m. in. do lokalizacji chromosomalnej wielu enzymów (Tanksley 1986) w tym również AAT. Hart (1976) dokonał rekombinacji podjednostek AAT z tych linii.

Zarówno dla tetraploidalnej pszenicy *T. durum* L. (AABB) jak i heksaploidalnej *T. aestivum* L. (AABBDD) obserwuje się trzy alloenzymy w cytoplazmatycznym paśmie enzymatycznym (AAT-3). Są one kodowane przez geny mieszczące się na 3 parze chromosomów homologicznych. Pozostałe izoenzymy kodują geny zlokalizowane na krótkich i długich ramionach 6 pary chromosomów homologicznych (Hart i in. 1976).

Przyjmuje się, że geny kodujące AAT zlokalizowane w genomie A odpowiadają za syntezę podjednostki A enzymu, geny w genomie B podjednostki B natomiast geny z genomu D występującego u *T. aestivum* L. podjednostki D przy czym według Harta i in. (1976) podjednostki AAT wytwarzane przez genomy B i D są tożsame. A zatem można przyjąć, że zarówno u *T. durum* L. jak i u *T. aestivum* L. wytwarzane są tylko dwa typy podjednostek tj. podjednostka A i B, które w paśmie cytoplazmatycznym łączą się ze sobą



na 3 możliwe sposoby tj. AA, AB i BB. Alloenzym występujący w pozycji AAT-3a jest zbudowany z podjednostek B, alloenzym z pozycji AAT-3b z podjednostek A i B natomiast AAT-3c z podjednostek A.

Zazwyczaj na zymogramach rozkład intensywności zabarwienia poszczególnych izoenzymów bezpośrednio świadczy o ich aktywności (jednostki enzymatyczne) a pośrednio o ich ilości. Według Harta (1976) rozkład w paśmie AAT-3 dla *T. aestivum* L. przedstawiał się jak 1 : 4 : 4 (AA : 4AB : 4BB) czyli prążki w pozycjach AAT-3a i AAT-3b były najintensywniejsze.

Należy podkreślić, że dotąd rozkład alloenzymów AAT w paśmie cytoplazmatycznym *T. aestivum* L. wynikający z różnej częstotliwości występowania podjednostek był oceniany jedynie jakościowo. *T. durum* L. nie było analizowane w ogóle pod tym względem.

## 2. CEL PRACY

Celem pracy była lokalizacja subkomórkowa pasm alloenzymatycznych aminotransferazy asparaginianowej z siewek pszenicy (*Triticum aestivum* L.). Kolejnym celem było potwierdzenie składu podjednostkowego alloenzymów pasma cytoplazmatycznego (AAT-3) u traw z rodzajów *Triticum* i *Aegilops*. Ponadto analizując komputerowo zymogramy zamierzano określić częstotliwość występowania podjednostek w alloenzymach pasma AAT-3 z siewek *Triticum durum* L. i *Triticum aestivum* L.

### 3. MATERIAŁ I METODY

#### 3.1. Materiał doświadczalny

Materiałem roślinnym były zielone części 10-14 dniowych siewek gatunku diploidalnego *Aegilops umbellulata* L. o formule genetycznej UU, gatunków tetraploidalnych *Triticum timopheevii* L. AAGG i *Triticum durum* L. AABB oraz gatunku heksaploidalnego *Triticum aestivum* L. AABBDD odmian Jasna i Chinese Spring z linią aneuploidalną CS 3AS Dt.

Przed wysianiem ziarno zaprawiono fungicydem Funaben-T. Rośliny uprawiano w kamerze hodowlanej na pożywce wodnej przy natężeniu fotosyntetycznej czynnej radiacji wynoszącym  $400 \mu\text{mol fotonów m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  i temperaturze  $22^{\circ}\text{C}$  w ciągu dnia (15 godzin) i  $16^{\circ}\text{C}$  w nocy.

#### 3.2. Metody badawcze

##### 3.2.1. Izolowanie chloroplastów

Chloroplasty izolowano zgodnie z procedurą opracowaną przez Spector i in. (1998). Aktywność fruktozobisfosfatazy (EC 3.1.3.11) enzymu markerowego dla chloroplastów oznaczano metodą spektrofotometryczną polegającą na pomiarze wzrostu absorbancji przy 340 nm (redukcja  $\text{NADP}^{+}$ ) jako wyniku reakcji katalizowanej przez izomerazę glukozofosforanową (EC 5.3.1.9) i bezpośrednio dehydrogenazę glukozo-6-fosforanową (EC 1.1.1.49) (Bergmayer 1974).

##### 3.2.2. Izolowanie mitochondriów

Zielone części siewek pszenicy rozdrabniano delikatnie przez 5 s w homogenizatorze (Ultra Turrax T-25) w proporcji 1 g materiału roślinnego na 3 ml 30 mM buforu morfolino-propanosulfonowego (MOPS) (K) pH 7.5 zawierającym: 0.3 M sacharozę, 0.2% albuminę z surowicy wołowej (BSA) i 0.6% poliwinylpolipirrolidon (PVP) a

następnie sączono przez Miracloth i wirowano przez 2 min. przy 5 000 g. Osad, który w znacznej mierze stanowiły fragmenty tkanek roślinnych a także duże ilości chloroplastów odrzucano a supernatant wirowano przez 3 min. przy 20 000 g. Uzyskany kolejny osad rozpuszczano w 24 ml 62.5 mM buforu Tris-HCl pH 6.8 zawierającego 10% glicerynę i wirowano przez 3 min. przy 20 000 g. Osad czyli frakcję mitochondrialną rozpuszczano w jak najmniejszej objętości buforu (o składzie jak wyżej).

Aktywność syntazy cytrynianowej (EC 4.1.3.7) enzymu markerowego dla mitochondriów oznaczano metodą spektrofotometryczną (Cooper i Beevers 1969) polegającą na pomiarze wzrostu absorbancji przy 412 nm w wyniku tworzenia się anionu 2-nitro-5-tiobenzoesanowego.

### 3.2.3. Częściowe oczyszczanie cytoplazmy

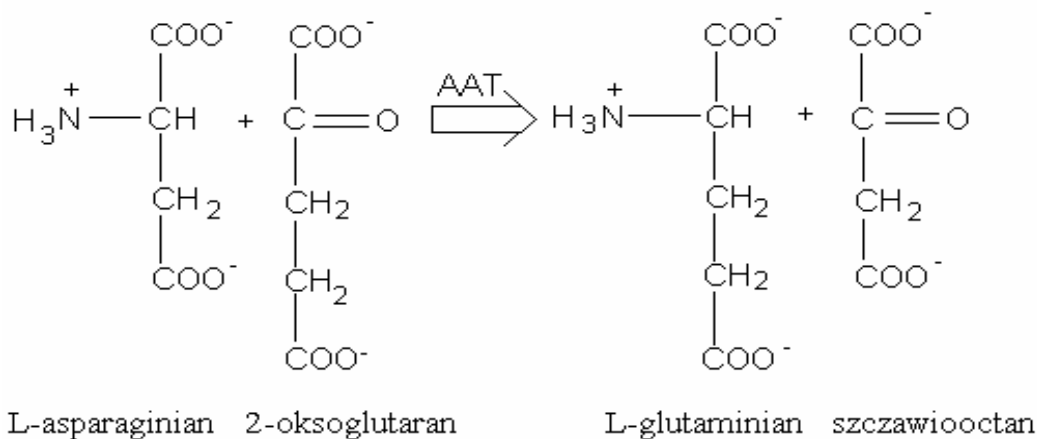
Homogenat przygotowano jak podczas izolacji mitochondriów (3.2.2.) a następnie sączono przez Miracloth i wirowano przez 2 min. przy 5 000 g. Otrzymany supernatant wirowano przez 1 godz. przy 100 000 g.

Aktywność dehydrogenazy mleczanowej (EC 1.1.1.27) enzymu markerowego dla cytoplazmy oznaczano metodą spektrofotometryczną (Bergmayer i Bernt 1974) polegającą na pomiarze spadku absorbancji przy 340 nm w wyniku utleniania NADH.

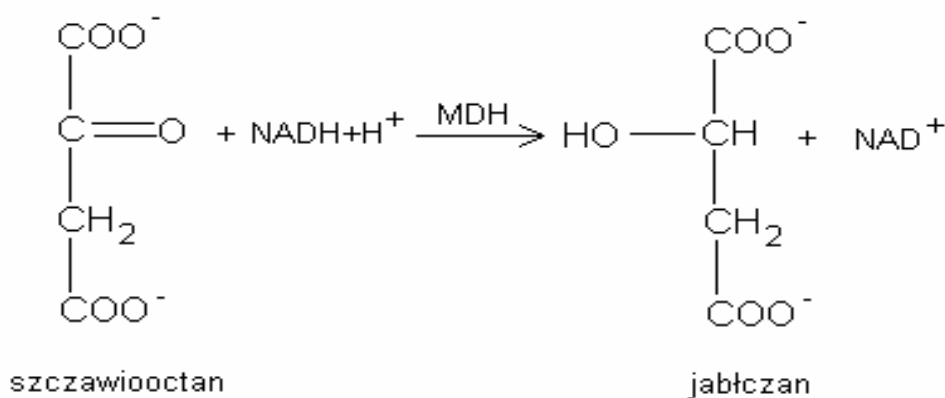
### 3.2.4. Spektrofotometryczna metoda oznaczania aktywności aminotransferazy asparaginianowej (AAT)

Aktywność enzymatyczną oznaczano w 0.1 M buforze fosforanowym pH 7.5 zawierającym: 0.2 M L-asparaginian, 0.13 mM NADH, 0.7 jednostek aktywności dehydrogenazy jabłczanowej i roztwór enzymu. Reakcję enzymatyczną rozpoczynano dodając 10 mM 2-oksoglutaran. Stosowanie L-asparaginianu w dużym nadmiarze w stosunku do 2-oksoglutaranu sprawiało, że równowaga reakcji transaminacji była przesunięta w kierunku tworzenia L-glutaminianu i szczawiooctanu (rys. 2).

Powstający szczawiooctan oznaczano przy udziale dehydrogenazy jabłczanowej (MDH) i NADH (rys.3). Obserwowany spadek absorbancji przy 340 nm w wyniku utleniania NADH był proporcjonalny do aktywności enzymatycznej AAT.



**Rysunek 2:** Pierwsza część reakcji w metodzie spektrofotometrycznego oznaczania aktywności AAT. Przeniesienie grupy aminowej z L-asparaginianu na 2-oksoglutaran z wytworzeniem L-glutaminianu i szczawiooctanu.



**Rysunek 3:** Druga część reakcji w metodzie spektrofotometrycznego oznaczania aktywności AAT. Przekształcenie szczawiooctanu do jabłczanu przy udziale dehydrogenazy jabłczanowej (MDH) i NADH.

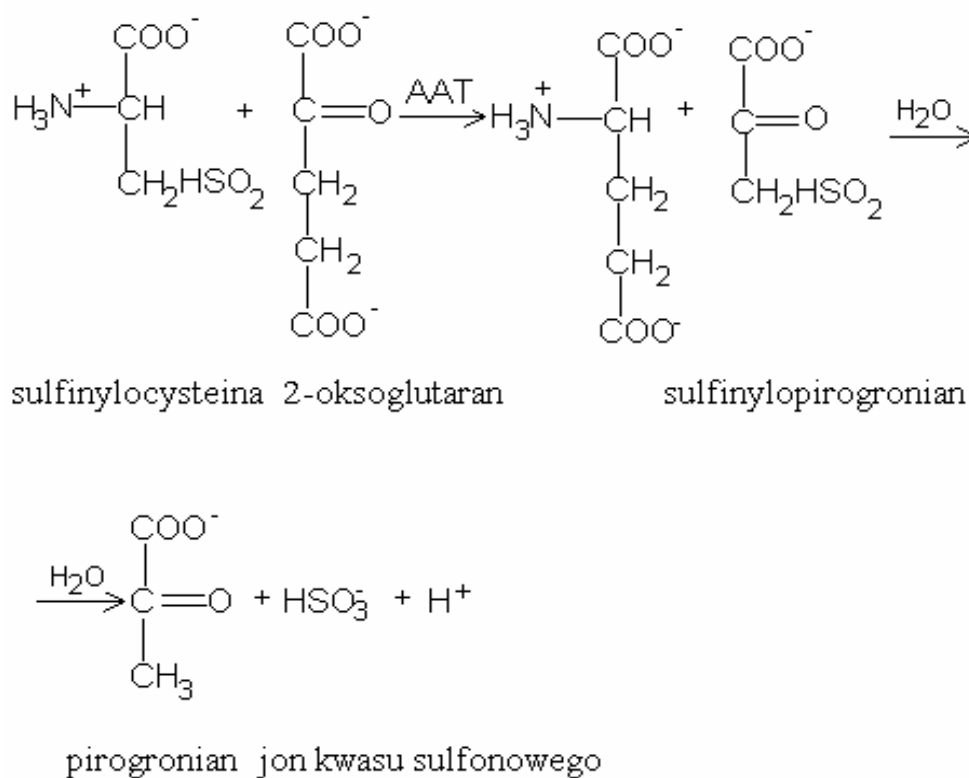
### 3.2.5. Elektroforeza analityczna w 7.5% żelu poliakryloamidowym

Elektroforezę prowadzono w aparacie Mini Protean firmy Bio-Rad. Do sporządzania 7.5% żelu rozwijającego stosowano 1.5 M bufor Tris-HCl pH 8.8 z dodatkiem 10% mannitolu natomiast do sporządzania 4% żelu zagęszczającego stosowano 0.5 M bufor Tris-HCl pH 6.8. Elektroforezę prowadzono w buforze Tris-glicyna pH 8.3 do momentu wyjścia znacznika (błękit bromofenolowy) z żelu.

### 3.2.6. Metoda pomiaru aktywności AAT w żelu poliakryloamidowym

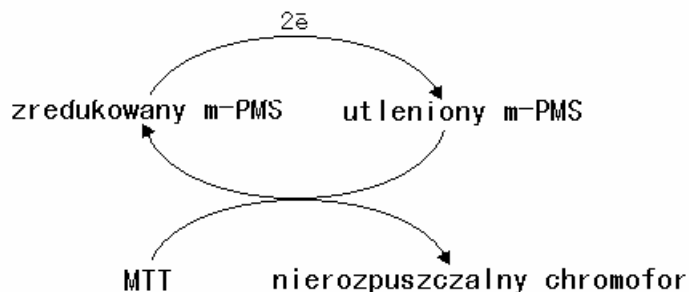
Żele barwiono na aktywność AAT w oparciu o metodę Stejskala (1994) z użyciem sulfinylocysteiny (CSA) jako substratu. Żel po elektroforezie inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej przez 20 min. w 0.1 M buforze Tris pH 7.5 zawierającym: 5mM 2-oksoglutaran, 0.1 mM fosforan pirydoksalu (PLP), 0.5 mM 3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl]-2,5-difenyl-tetrazolium bromidyny (MTT), 8mM CSA, 0.1 mM N-metylofenazyno metasulfonian (m-PMS)

W wyniku reakcji transaminacji z udziałem sulfinylocysteiny (CSA) jako substratu aminokwasowego oraz izoenzymów AAT powstawał sulfinylopirogronian, który ulegał hydrolizie do pirogronianu i kwasu sulfonowego (rys.4).



**Rysunek 4: Reakcja transaminacji z udziałem sulfinylocysteiny (CSA) jako substratu katalizowana przez AAT oraz hydroliza sulfinylopirogronianu do pirogronianu i jonu kwasu sulfonowego.**

Jon tego kwasu podlegał utlenianiu w systemie tetrazolowym składającym się z m-PMS i MTT (rys. 5). MTT po zredukowaniu tworzył nierozpuszczalny chromofor koloru ciemnoniebieskiego świadczący o występowaniu aktywnej AAT.



**Rysunek 5: Działanie systemu tetrazolowego.**

Następnie chromofor poddawano pomiarowi intensywności zabarwienia za pomocą programu do analizy zeskanowanych zdjęć (NIH Image). Program liczył średnią wartość dla wszystkich pikseli w zaznaczonym obszarze w skali przyjmującej wartości od 0 do 255. Otrzymane w wyniku liczby stanowiły różnicę między wartością średnią dla całego pasma lub pojedynczego prążka a wartością dla niezabarwionego obszaru na zymogramie.

### 3.2.6. Oznaczanie białka

**S**tężenie białka oznaczano metodą Bradford (1976) stosując albuminę z surowicy wołu (BSA) jako standard.

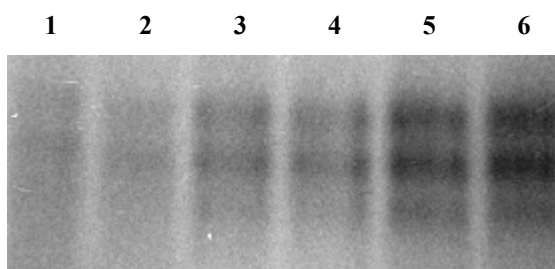
\*\*\*

Aktywność właściwą enzymów wyrażono w  $\mu\text{mol}$  utworzonego produktu w ciągu 1 minuty w temperaturze  $25^\circ\text{C}$  (jednostki aktywności) w przeliczeniu na 1 mg białka.

## 4. WYNIKI

### 4.1. Badanie zależności między aktywnością AAT nanoszonego wyciągu a intensywnością zabarwienia chromoforu

Na rysunku 6 zamieszczono zymogram aminotransferazy asparaginianowej dla cytoplazmatycznego pasma enzymatycznego (AAT-3) tetraploidalnej pszenicy (*Triticum durum* L.). Poszczególne ścieżki przedstawiają uzyskane obrazy dla 3 różnych ilości wyciągu a tym samym 3 różnych poziomów aktywności AAT.



Rysunek 6: Zymogram pasma AAT-3 dla *T. durum*. Do studzienek 1-2 naniesiono po 15  $\mu$ l (0.26 jednostek aktywności) do studzienek 3-4 naniesiono po 25  $\mu$ l (0.43 jedn. aktyw.) a do studzienek 5-6 naniesiono po 35  $\mu$ l (0.61 jedn. aktyw.) wyciągu o aktywności właściwej AAT wynoszącej 0.5  $\mu$ mola szczawiooctanu  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ .

Obrazy AAT-3 dla każdej ze ścieżek na żelu (rys. 6) poddano pomiarowi na intensywność zabarwienia chromoforu za pomocą programu do analizy zeskanowanych zdjęć (NIH Image) (tab. 1).

Tabela 1: Pomiar intensywności zabarwienia chromoforu dla pasma AAT-3 w zależności od ilości jednostek aktywności AAT nanoszonego wyciągu do studzienek. Opis stosowanych jednostek przy pomiarze całych pasm w rozdziale Materiał i metody (3.2.6).

studzienki	1	2	3	4	5	6
Aktywność całkowita AAT (jedn. aktyw.)	0.26		0.43		0.61	
Wyniki pomiaru całych pasm	11.75	9.76	13.21	13.07	23.53	25.00



Analiza wyników pomiaru intensywności zabarwienia chromoforu dla pasma AAT-3 w zależności od ilości jednostek aktywności AAT nanoszonego wyciągu do studzienek (tab. 1) wskazuje na istnienie wprost proporcjonalnej zależności między intensywnością zabarwienia chromoforu dla cytoplazmatycznego pasma enzymatycznego a aktywnością całkowitą AAT.

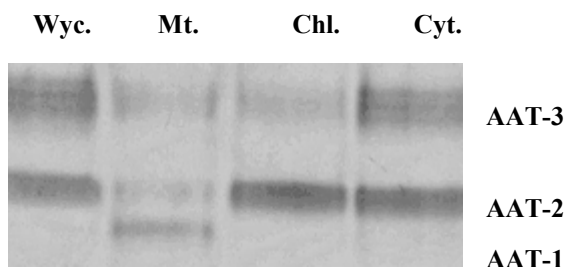
#### 4.2. Lokalizacja wewnątrzkomórkowa izoenzymów AAT

W wyniku zastosowania procedur opisanych w rozdziale Materiał i metody (3.2.1., 3.2.2., 3.2.3.) uzyskano frakcję mitochondriów o stopniu oczyszczenia 2.2, frakcję chloroplastów o stopniu oczyszczenia 2 i frakcję cytoplazmatyczną o stopniu oczyszczenia 1.7. Stopień oczyszczenia liczono jako iloraz aktywności właściwej enzymów markerowych dla poszczególnych frakcji i aktywności właściwej w wyciągu.

**Tabela 2: Stopnie oczyszczenia poszczególnych frakcji liczone na podstawie aktywności właściwej ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) enzymów markerowych: Wyc., wyciąg; Mt., mitochondria; Chl., chloroplasty; Cyt., cytoplazma.**

	Wyc.	Mt.	Chl.	Cyt.	Stopień oczyszczenia
Fruktozobisfosfataza	0.13		0.26		2.0
Syntaza cytrynianowa	0.10	0.22			2.2
Dehydrogenaza mleczanowa	0.03			0.05	1.7

Podczyszczone frakcje subkomórkowe naniesiono do studzienek w żelu i po rozdziale elektroforetycznym barwiono żel na aktywność AAT (rys. 7).

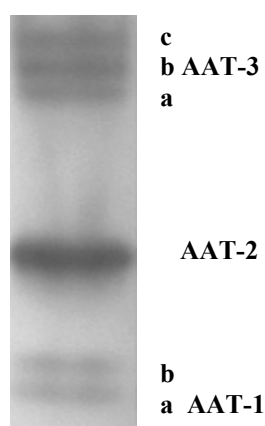


**Rysunek 7: Zymogram przedstawiający lokalizację subkomórkową poszczególnych pasm enzymatycznych AAT u heksaploidalnej pszenicy (*T. aestivum* L.). Wyc., wyciąg; Mt., mitochondria; Chl., chloroplasty; Cyt., cytoplazma. Do studzienek naniesiono po 0.6 jednostki aktywności AAT.**

Na podstawie obrazu elektroforetycznego dla wyizolowanych frakcji subkomórkowych metodą wirowania różnicowego i w gradiencie gęstości stwierdzono, że AAT z siewek pszenicy wykazuje trzy różniące się ruchliwością elektroforetyczną pasma enzymatyczne: AAT-1, AAT-2 i AAT-3 każde charakterystyczne dla innego przedziału komórkowego. Pasma AAT-1 zlokalizowano w mitochondriach, AAT-2 w chloroplastach natomiast AAT-3 w cytoplazmie.

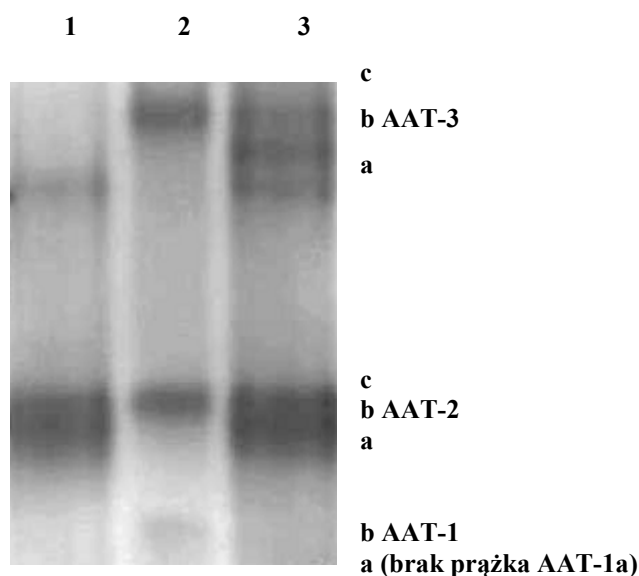
#### 4.3. Obraz elektroforetyczny AAT u traw z rodzajów *Triticum* i *Aegilops*

Celem tych badań było scharakteryzowanie poszczególnych pasm enzymatycznych u traw o różnym składzie genetycznym (diploid, tetraploid, heksaploid i aneuploid) z rodzajów *Triticum* i *Aegilops* głównie pod kątem ilości prążków (alloenzymy) w obrębie każdego z pasm.



**Rysunek 8: Zymogram tetraploidalnego gatunku *T. timopheevii* L. o formule genetycznej AAGG.**

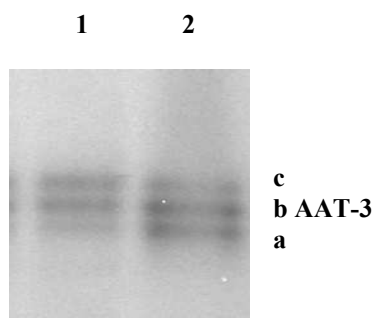
Na zymogramie dla tetraploidalnego gatunku pszenicy (*Triticum timopheevii* L.) o formule genetycznej AAGG bardzo dobrze widoczne są dwa prążki w pierwszym paśmie enzymatycznym (AAT-1) (rys. 8). Podobne zdjęcia otrzymano dla tetraploidalnego *Triticum durum* L. i heksaploidalnego *Triticum aestivum* L. Obraz pasma AAT-1 trudno było uzyskać bowiem próbki nanoszone do studzienek musiały wykazywać bardzo wysoką aktywność całkowitą AAT, aby było ono w ogóle widoczne. Uzyskiwany obraz pasma AAT-1 często był niewyraźny. W paśmie AAT-2 widoczny jest pojedynczy prążek o dużej intensywności zabarwienia co wynika prawdopodobnie z nałożenia się trzech alloenzymów (rys. 8) natomiast w paśmie AAT-3 widoczne są trzy alloenzymy (rys. 8).



**Rysunek 9: Zymogram linii aneuploidalnej CS 3 AS Dt (ścieżka 1); gatunku diploidalnego *Ae. umbellulata* L. (ścieżka 2); gatunku tetraploidalnego *T. durum* L. (ścieżka 3).**

U linii aneuploidalnej CS 3 AS Dt<sup>1</sup> (rys. 9, ścieżka 1) w paśmie AAT-2 widoczne są trzy prążki a w paśmie AAT-3 jeden w pozycji AAT-3a natomiast u diploidalnego gatunku *Aegilops umbellulata* L. o formule genetycznej UU (rys. 9, ścieżka 2) we wszystkich pasmach enzymatycznych widoczne są pojedyncze prążki w pozycjach: AAT-1b, AAT-2c i AAT-3c. Na rysunku 9 (ścieżka 3) przedstawiono wynik rozdziału dla gatunku tetraploidalnego *Triticum durum* L. W paśmie AAT-2 i AAT-3 widoczne są po 3 prążki natomiast w paśmie AAT-1 znajdują się przynajmniej w założeniu dwa co jest bardziej widoczne dla blisko spokrewnionego tetraploidalnego gatunku *Triticum timopheevii* L. (rys. 8).

<sup>1</sup> Zapis CS 3AS Dt oznacza roślinę ditelosomiczną pozbawioną ramion długich na 3 parze chromosomów homologicznych w obrębie genomu A.



**Rysunek 10: Zymogram cytoplazmatycznego pasma enzymatycznego (AAT-3) gatunku tetraploidalnego *T. durum* L. (ścieżka 1) i gatunku heksaploidalnego *T. aestivum* L. (ścieżka 2).**

U wszystkich przebadanych gatunków cytoplazmatyczne pasmo enzymatyczne (AAT-3) charakteryzuje się najmniejszą ruchliwością w czasie elektroforezy, ale występujące w jego obrębie alloenzymy ulegają wyraźnemu rozdzieleniu. Dla gatunku tetraploidalnego *T. durum* L. (rys. 10, ścieżka 1) najwyższą intensywność obserwowano dla prążków AAT-3b i AAT-3c natomiast dla heksaploidalnej pszenicy *T. aestivum* L. (rys. 10, ścieżka 2) dla prążków AAT-3a i AAT-3b.

#### **4.4. Zastosowanie modelu matematycznego do określenia częstotliwości występowania podjednostek AAT w paśmie cytoplazmatycznym**

Znając skład podjednostkowy alloenzymów w paśmie AAT-3 z *T. aestivum* L. (Hart i in. 1976) oraz przyjmując, że skład ten jest analogiczny u *T. durum* L. podjęto próbę określenia częstotliwości występowania podjednostek A i B tworzących alloenzymy w pozycjach AAT-3a (BB), AAT-3b (AB) i AAT-3c (AA) w obu tych gatunkach.

W tym celu wyliczono najpierw teoretyczne rozkłady alloenzymów (wyrażone w procentach) dla różnych częstotliwości występowania podjednostek. (tab. 4 i 6). Dla przykładu jeżeli założymy, że wszystkie podjednostki enzymu w paśmie AAT-3 są dla obydwu gatunków pszenic wytwarzane z tą samą częstotliwością tzn.  $A = 50\%$  i  $B = 50\%$  to otrzymamy następujący rozkład dla *T. durum* L.  $(A + B)^2 = AA + 2AB + BB$  czyli proporcje w częstotliwości występowania aktywnych dimerów enzymu wynoszą w pozycji AAT-3c (AA) = 25%, w pozycji AAT-3b (AB) = 50% i w pozycji AAT-3a (BB) = 25% natomiast dla *T. aestivum* L.  $(A + 2B)^2 = AA + 4AB + 4BB$  czyli AA = 0.25, AB = 1 i BB = 1 a po wyrażeniu w procentach AAT-3c (AA) = 11.3% , AAT-3b (AB) = 44.3% i AAT-3a (BB) = 44.3%. Do tak obliczonych rozkładów teoretycznych przyrównano

rozkład doświadczalny czyli wyniki pomiaru intensywności zabarwienia prążków uzyskane za pomocą programu NIH Image i wyrażono je w procentach. Dla każdego z alloenzymów obliczono odchylenie standardowe średniej arytmetycznej (S). Następnie sprawdzono zgodność otrzymanego rozkładu doświadczalnego z przyjętymi rozkładami teoretycznymi przy pomocy testu  $\chi^2$ .

#### 4.4.1. Model matematyczny dla *T. durum* L.

Wstępnie porównując wyniki teoretycznego rozkładu występowania dimerów z obrazem na zymogramie dla *T. durum* L. (rys. 10, ścieżka 1) widać, że rozkład intensywności zabarwienia prążków jest inny niż dla przypadku kiedy  $A = B = 50\%$  i częstotliwość pojawiania się poszczególnych alloenzymów wynosi: AAT-3c (AA) = 25%; AAT-3b (AB) = 50% i AAT-3a (BB) = 25%. Można zaobserwować, że prążek w pozycji AAT-3c jest intensywniej zabarwiony od prążka AAT-3a (rys. 10, ścieżka 1). Świadczy to o tym, że częstotliwość występowania podjednostki A musi być większa od B.

**Tabela 3: Wyznaczanie wartości średniej rozkładu doświadczalnego alloenzymów w paśmie cytoplazmatycznym dla *T. durum* L.**

Pozycja prążka	Wyniki pomiaru doświadczalnego dla różnych ścieżek elektroforetycznych					Rozkład doświadczalny (%)					wartość średnia (%)	S
	numer ścieżki					numer ścieżki						
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5		
AAT-3c (AA)	131.1	132.3	131.6	131.5	131.8	31.3	33.5	33.2	34.5	34.4	<b>33.4</b>	1.55
AAT-3b (AB)	133.4	134.9	133.9	133.4	133.5	46.1	47.6	47.1	46.6	44.4	<b>46.4</b>	1.10
AAT-3a (BB)	129.7	129.6	129.3	129.1	129.6	22.6	18.9	19.7	18.9	21.2	<b>20.3</b>	1.44
kontrola	126.1											

**Tabela 4: Porównanie wyników rozkładu doświadczalnego z rozkładem teoretycznym dla *T. durum* L.**

Przyjęte proporcje występowania podjednostek	Uzyskany rozkład teoretyczny (%)	Średni rozkład doświadczalny (%)	Test $\chi^2$
A : B	AA : 2AB : BB	AA : 2AB : BB	
55-45	30.3 : 49.5 : 20.3	<b>33.4 : 46.4 : 20.3</b>	0.514
56-44	31.4 : 49.3 : 19.4		0.339
<b>57-43</b>	<b>32.5 : 49.0 : 18.5</b>		<b>0.338</b>
58-42	33.6 : 48.7 : 17.6		0.523
59-41	34.8 : 48.4 : 16.8		0.868

Średni procentowy rozkład doświadczalny dla *T. durum* L. wynosił **33.4%** dla prążka w pozycji AAT-3c (AA); **46.4%** dla AAT-3b (AB) i **20.3%** dla AAT-3a (BB).

Następnie porównano go z rozkładem teoretycznym (tab. 4). Najniższą wartość testu  $\chi^2$  wynoszącą **0.338** otrzymano dla rozkładu teoretycznego **32.5% (AA)**; **49.0% (AB)** i **18.5% (BB)** co oznacza częstotliwość występowania podjednostek: **A = 57%** i **B = 43%**.

#### 4.4.2. Model matematyczny dla *T. aestivum* L.

**W** przypadku *T. aestivum* L. podjednostki B cytoplazmatycznego izoenzymu AAT są kodowane przez geny pochodzące z genomu B i D dlatego też więcej jest wytwarzanych dimerów BB. Obserwuje się zatem intensywniejsze zabarwienie dla alloenzymów w pozycjach AAT-3a i AAT-3b.

**Tabela 5: Wyznaczenie wartości średniej rozkładu doświadczalnego alloenzymów w cytoplazmatycznym paśmie dla *T. aestivum* L.**

Pozycja prążka	Wyniki pomiaru doświadczalnego dla różnych ścieżek elektroforetycznych					Rozkład doświadczalny (%)					wartość średnia (%)	S
	numer ścieżki					numer ścieżki						
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5		
AAT-3c (AA)	128.9	128.6	129.2	129.1	129.6	15.6	13.2	16.5	16.6	21.3	<b>16.6</b>	<b>1.37</b>
AAT-3b (AB)	135.4	136.7	136.0	135.0	133.2	46.4	48.8	47.7	44.4	40.7	<b>45.6</b>	<b>2.85</b>
AAA-3a (BB)	133.6	134.2	133.4	133.8	132.7	38.0	38.0	35.8	39.0	38.0	<b>37.8</b>	<b>1.05</b>
kontrola	125.6											

**Tabela 6: Porównanie wyników rozkładu doświadczalnego alloenzymów w cytoplazmatycznym paśmie z rozkładem teoretycznym dla *T. aestivum* L.**

Przyjęte proporcje występowania podjednostek	Rozkład teoretyczny	Rozkład teoretyczny (%)	Rozkład doświadczalny (%)	Test $\chi^2$
<b>A : B</b>	<b>AA : 4AB : 4BB</b>	<b>AA : 4AB : 4BB</b>	<b>AA : 4AB : 4BB</b>	
55-45	0.30 : 0.99 : 0.81	14.4 : 47.1 : 38.5	<b>16.6 : 45.6 : 37.8</b>	0.400
56-44	0.31 : 0.98 : 0.77	15.1 : 47.5 : 37.3		0.232
<b>57-43</b>	<b>0.32 : 0.98 : 0.73</b>	<b>15.9 : 47.8 : 36.1</b>		<b>0.230</b>
58-42	0.34 : 0.97 : 0.71	16.7 : 48.1 : 35.2		0.320
59-41	0.35 : 0.97 : 0.67	17.6 : 48.7 : 33.7		0.760

Dla częstotliwości występowania podjednostki **A = 57%** i **B = 43%** uzyskano rozkład teoretyczny **15.9% (AA)**, **47.8% (AB)** i **36.1% (BB)**, który najbardziej pasował do rozkładu doświadczalnego obserwowanego dla cytoplazmatycznego pasma enzymatycznego *T. aestivum* L. tzn. **16.6%** dla prążka w pozycji AAT-3c (AA), **45.6%** dla AAT-3b (AB) i **37.8%** dla AAT-3a (BB) (test  $\chi^2$  wyniósł **0.23**).

## 5. DYSKUSJA

Występowanie tego samego typu genomu nawet u różnych gatunków o różnym stopniu ploidalności wskazuje na ich bliskie pokrewieństwo i stanowi punkt wyjściowy do porównywania wyników pomiędzy nimi. Przedstawiony poniżej schemat jest podsumowaniem wyników elektroforetycznej analizy traw z rodzaju *Triticum* i *Aegilops* ze względu na występowanie izoenzymów AAT.

<i>Ae. umbellulata</i>	<i>T.durum</i> & <i>T. timopheevii</i>	<i>T.aestivum</i>	CS 3AS Dt		
-	-	-	-		
<u>AA</u>	<u>AA</u> 33.4%	<u>AA</u> 16.6%		c	Pasma cytoplazmatyczne (AAT-3)
	<u>AB</u> 46.4%	<u>AB</u> 45.6%		b	
	<u>BB</u> 20.3%	<u>BB</u> 37.8%	<u>BB</u>	a	
<u>AA<sub>2</sub></u>	<u>AA<sub>2</sub></u>	<u>AA<sub>2</sub></u>	<u>AA<sub>2</sub></u>	c	Pasma chloroplastowe (AAT-2)
	<u>AB<sub>2</sub></u>	<u>AB<sub>2</sub></u>	<u>AB<sub>2</sub></u>	b	
	<u>BB<sub>2</sub></u>	<u>BB<sub>2</sub></u>	<u>BB<sub>2</sub></u>	a	
<u>AA<sub>3</sub></u>	<u>AA<sub>3</sub></u>	<u>AA<sub>3</sub></u>	<u>AA<sub>3</sub></u>	b	Pasma mitochondrialne (AAT-1)
	<u>BB<sub>3</sub></u>	<u>BB<sub>3</sub></u>	<u>BB<sub>3</sub></u>	a	
+	+	+	+		

Schemat 1: Modelowe przedstawienie zymogramów dla *Ae. umbellulata* L., *T. durum* L., *T. Timopheevii* L., *T. aestivum* L. oraz linii aneuploidalnej CS 3AS Dt sporządzone na podstawie rysunków 7-10 zamieszczonych w rozdziale Wyniki. Cyfry w dolnym indeksie oznaczają lokus z którego pochodzą geny kodujące podjednostki AAT.

\*\*\*

### **Pasma enzymatyczne a lokalizacja wewnątrzkomórkowa izoenzymów AAT**

**N**a podstawie obrazu izoenzymatycznego przedstawiającego lokalizację wewnątrzkomórkową poszczególnych pasm enzymatycznych AAT u heksaploidalnej pszenicy (*T. aestivum* L.) stwierdzono, że pasmo AAT-1 jest charakterystyczne dla mitochondriów, pasmo AAT-2 dla chloroplastów natomiast pasmo AAT-3 dla cytoplazmy (schemat 1). Poszczególnym pasmom enzymatycznym u różnych roślin odpowiadają różne przedziały subkomórkowe i tak na przykład pasmu AAT-1 u fasoli odpowiada izoenzym glioksysomalny (Wadsworth i in. 1995); w łubinie - izoenzym cytoplazmatyczny (Gregerson i in. 1994) natomiast u *Arabidopsis* i kukurydzy - izoenzym mitochondrialny (Schultz i Coruzzi 1995, Scandalios i in. 1995). Wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie izoenzymów AAT badano u heksaploidalnej pszenicy (*T. aestivum* L.) jednak wydaje się wysoce prawdopodobnym, że pasma enzymatyczne AAT mają podobną lokalizację subkomórkową u innych gatunków traw z rodzajów *Triticum* i *Aegilops*. U przedstawicieli tych rodzajów występują blisko spokrewnione typy genomów, które kodują podjednostki o podobnej sekwencji aminokwasowej. Aktywne dimery tworzone przez te podjednostki zwykle wykazują analogiczną ruchliwość elektroforetyczną.

\*\*\*

### **Budowa podjednostkowa izoenzymów AAT**

**G**eny kodujące podjednostki AAT w pszenicy znajdują się w trzech loci tj. na długich ramionach 3 pary chromosomów homologicznych a także na krótkich i długich ramionach 6 pary chromosomów homologicznych (Hart i in. 1976). Każdy z genów koduje pojedynczą podjednostkę. Stopień podobieństwa sekwencji aminokwasowej między podjednostkami AAT kodowanymi przez geny z różnych loci i geny alleliczne wpływa na ich łączenie się w dimery. Wiadomo, że u zwierząt homologia w sekwencji aminokwasowej podjednostek AAT kodowanych przez geny z tego samego loci i pochodzących nawet od różnych gatunków wynosi 80-90% zarówno dla izoenzymu cytoplazmatycznego jak i dla izoenzymu mitochondrialnego. Natomiast sekwencje podjednostek izoenzymów AAT: cytoplazmatycznego i mitochondrialnego (różne loci) u tych samych gatunków zwierząt wykazują zaledwie około 50% tożsamość (Palmisano i in. 1995).

W niniejszej pracy zaobserwowano, że podjednostki AAT kodowane przez geny pochodzące z genomów G (*T. timopheevii* L. o formule AAGG) oraz D (*T. aestivum* L. AABDD) wpływają na ruchliwość elektroforetyczną tworzonych przez siebie



izoenzymów podobnie jak podjednostki kodowane przez geny z genomu B (*T. durum* L. AABB). Tę samą analogię stwierdzono między podjednostkami pochodzącymi z genomu U (*Ae. umbellulata* L. UU) i genomu A (*T. durum* L. AABB, *T. timopheevii* L. AAGG czy też *T. aestivum* L. AABBDD). W związku z tym u *T. durum* L., *T. timopheevii* L. i *T. aestivum* L. w każdym z 3 loci kodowane są po 2 typy podjednostek. U linii aneuploidalnej CS 3AS Dt w loci kodującym izoenzymy pasma cytoplazmatycznego 1 typ podjednostek a w pozostałych loci po 2 typy. Z kolei w *Ae. umbellulata* L. w każdym z 3 loci po 1 podjednostce.

3 para chromosomów homologicznych (koduje alloenzymy w paśmie cytoplazmatycznym) genomu A linii aneuploidalnej CS 3AS Dt jest pozbawiona długich ramion a zatem linia ta nie może wytwarzać podjednostki A. Linia CS 3AS Dt syntetyzuje tylko podjednostki pochodzące z genomów B i D, które jak wspomniano wyżej, przyjęto traktować za tożsame. W związku z tym dla linii CS 3AS Dt obserwuje się tylko jeden prążek w pozycji AAT-3a (schemat 1). Jest on wynikiem aktywności enzymatycznej homodimeru zbudowanego z podjednostek typu B.

Gatunek diploidalny *Ae. umbellulata* L. wytwarza 3 rodzaje podjednostek AAT pochodzących z 3 loci, które nie rekombinują ze sobą. Na zymogramie dla tego gatunku obserwuje się 3 prążki, każdy w innym paśmie (schemat 1). W cytoplazmatycznym paśmie enzymatycznym widoczny jest prążek w pozycji AAT-3c odpowiadający homodimerowi zbudowanemu z podjednostek A (schemat 1), których biosyntezę koduje genom U.

Występowanie na zymogramach gatunków tetraploidalnych (*T. durum* L., *T. timopheevii* L.) i gatunku heksaploidalnego (*T. aestivum* L.) prążków w paśmie AAT-3 o pośredniej ruchliwości elektroforetycznej w stosunku do homodimerów AA (*Ae. umbellulata* L., AAT-3c) i BB (linia CS 3AS Dt, AAT-3a) (schemat 1) można uważać za potwierdzenie proponowanego składu podjednostkowego alloenzymów w paśmie cytoplazmatycznym tj. prążek AAT-3a zbudowany z dimerów BB, AAT-3b z dimerów AB i AAT-3c z dimerów AA.

Przyпускаjąc, że podobnie zbudowane są alloenzymy pasma chloroplastowego (AAT-2). To znaczy prążek w pozycji AAT-2a odpowiada dimerowi zbudowanemu z podjednostek B, prążek AAT-2b dimerowi utworzonemu z podjednostek A i B natomiast prążek AAT-2c dimerowi AA (schemat 1).

W paśmie mitochondrialnym dla *Ae. umbellulata* L. obserwuje się 1 prążek w pozycji AAT-1b. Zakładam, że jest on zbudowany z podjednostek A, których biosyntezę

koduje genom U. Z kolei dla *T. durum* L. (AABB), *T. timopheevii* L. (AAGG) i *T. aestivum* L. (AABBDD) obserwuje się prążek w pozycji AAT-1a. Przyjmuję, że jest on zbudowany z podjednostek B, których biosyntezę koduje odpowiednio: genom B, G i BD. Na zymogramach AAT z tych 3 gatunków w paśmie mitochondrialnym brakuje 3-ego prążka o pośredniej ruchliwości elektroforetycznej w stosunku do AA i BB. Prawdopodobnie dwie różne podjednostki A i B nie rekombinują ze sobą.

\*\*\*

### **Częstotliwość wytwarzania podjednostek A i B w paśmie cytoplazmatycznym *T. durum* L. i *T. aestivum* L.**

**M**etoda wyznaczania częstotliwości występowania podjednostek kodowanych przez allele na podstawie analizy ilościowej zymogramów była stosowana dla różnych enzymów: dla dehydrogenazy glicerofosforanowej u Muszki owocowej (Leibenguth 1975); dehydrogenazy alkoholowej w kukurydzy (Schwartz 1973) czy też esterazy u *Ephestia* (Leibenguth 1973). Występowanie zależności między intensywnością zabarwienia chromoforu a ilością nanoszonych jednostek aktywności AAT pozwala przypuszczać, że zastosowana w pracy metoda analizy ilościowej jest również przydatna do tego celu. Z zebranych przeze mnie informacji wynika, że u pszenicy dla AAT dotychczas prowadzono tylko analizy jakościowe zymogramów na podstawie których stwierdzano, że częstotliwość występowania alleli w paśmie cytoplazmatycznym w populacji wynosi po 50% dla allelu A i B (Tanksley i Orton 1986; Scandalios i in. 1975; Hart i in. 1976).

Posługując się modelem matematycznym oraz programem komputerowym do mierzenia intensywności prążków na zeskanowanych zymogramach wyliczyłem, że zarówno u *T. durum* L. jak i *T. aestivum* L. częstotliwość występowania podjednostek A w pojedynczej rośliny wynosi 57% i B 43% (podobną częstotliwość otrzymano dla *T. timopheevii* L.- wyniki nie zamieszczone). Różnica między częstotliwością występowania podjednostek A i B dla *T. durum* L. i *T. aestivum* L. jest duża, albowiem wynosi 14 stóp procentowych. Podobną różnicę obserwowano dla fosfatazy kwaśnej z *Drosophila melanogaster* L. (Efron 1971) natomiast dla dehydrogenazy glicerofosforanowej z tego samego gatunku (Leibenguth 1975) różnica ta była już bardzo mała.

Sądzę, że określone częstotliwości występowania podjednostek w paśmie cytoplazmatycznym dla *T. durum* L. i *T. aestivum* L. (A = 57% i B = 43%) oraz różnice w ilości prążków widocznych na zymogramach AAT u różnych gatunków pszenic (od 3 izoenzymów obserwowanych dla *Ae. umbellulata* L. do 8 dla np. *T. timopheevii* L.) są

efektem działania mechanizmu adaptacyjnego roślin do środowiska naturalnego. Badań zmierzających do określenia zależności między stopniem adaptacji roślin i stopniem ploidalności nie prowadziłem, ale zaobserwowałem, że gatunki diploidalne: *Ae. umbellulata* L. oraz *Ae. speltoides* L. i *T. monococcum* L. (wyniki nie zamieszczone) dużo gorzej rosły od gatunków tetraploidalnych; *T. durum* L. i *T. timopheevii* L. a te z kolei wolniej od gatunku heksaploidalnego *T. aestivum* L. odmian Jasna i Chinese Spring).

Wydaje się, że zastosowana metoda stanowi pewną alternatywę dla metod genetycznych i immunochemicznych używanych do oceny wartości genetycznej różnych gatunków.

## 6. WNIOSKI

**P**asmo o największej ruchliwości elektroforetycznej (AAT-1) zlokalizowano w mitochondriach, pasmo o pośredniej ruchliwości (AAT-2) w chloroplastach natomiast pasmo o najmniejszej ruchliwości elektroforetycznej (AAT-3) w cytoplazmie.

\*\*\*

**I**stnieje wprost proporcjonalna zależność między intensywnością zabarwienia chromoforu a aktywnością całkowitą aminotransferazy asparaginianowej dla cytoplazmatycznego pasma enzymatycznego (AAT-3).

\*\*\*

**Z**aobserwowano, że podjednostki AAT kodowane przez geny pochodzące z genomów G (*T. timopheevii* L. AAGG) oraz D (*T. aestivum* L. AABBDD) wpływają na ruchliwość elektroforetyczną tworzonych przez siebie izoenzymów podobnie jak podjednostki kodowane przez geny z genomu B (*T. durum* L. AABB). Tą samą analogię stwierdzono między podjednostkami pochodzącymi z genomu U (*Ae. umbellulata* L. UU) i genomu A (*T. durum* L. AABB, *T. timopheevii* L. AAGG czy też *T. aestivum* L. AABBDD).

\*\*\*

**S**posób kodowania alloenzymów w cytoplazmatycznym paśmie enzymatycznym (AAT-3) dla *Triticum durum* L. i *Triticum aestivum* L. jest zgodny z hipotezą wysuniętą przez Harta i in. (1976).

\*\*\*

**M**etoda sporządzania zymogramów w połączeniu z programem komputerowym do analizy zeskanowanych zdjęć w oparciu o teoretyczny model dziedziczenia alloenzymów w cytoplazmatycznym paśmie enzymatycznym umożliwia wyliczenie częstotliwości występowania podjednostek różnych enzymów.

\*\*\*

**C**zęstotliwość występowania podjednostki A wynosi 57% natomiast podjednostki B 43% zarówno dla pszenicy tetraploidalnej (*Triticum durum* L.) jak i dla heksaploidalnej (*Triticum aestivum* L.).

## 7. STRESZCZENIE

Przedmiotem badań były zymogramy AAT roślin o różnym składzie genetycznym. Aktywność izoenzymów AAT po rozdziale elektroforetycznym w żelu poliakryloamidowym wykrywano metodą Stejskala z użyciem sulfinylocysteiny jako substratu aminokwasowego.

Na podstawie zymogramu AAT u *T. aestivum* L. stwierdzono, że pasmo o największej ruchliwości elektroforetycznej odpowiada - mitochondriom, pasmo o pośredniej ruchliwości - chloroplastom natomiast pasmo o najmniejszej ruchliwości - cytoplazmie.

Analizując obrazy izoenzymatyczne gatunku diploidalnego (*Ae. umbellulata* L.), gatunków tetraploidalnych (*T. durum* L., *T. timopheevii* L.), gatunku heksaploidalnego (*T. aestivum* L.) i linii aneuploidalnej CS 3AS Dt określono skład podjednostkowy alloenzymów w poszczególnych pasmach enzymatycznych.

Wykorzystując model matematyczny, program komputerowy NIH Image oraz fakt istnienia zależności między intensywnością zabarwienia prążków a ilością nanoszonych jednostek aktywności AAT wyliczono częstotliwość występowania podjednostek w paśmie cytoplazmatycznym dla *T. durum* L. i *T. aestivum* L. W obydwu przypadkach częstotliwość ta wynosiła dla podjednostki A - 57% a dla B - 43%.

## 8. LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA

**Burnell J., Hatch M., 1988:** Photosynthesis in phosphoenolpyruvate carboxykinase type C<sub>4</sub> plants, pathways of C<sub>4</sub> acid decarboxylation in bundle sheat cells of *Urochlea panicoides* L. Arch. Biochem. Biophys. 260: 187-189

**Cooper T., Beevers H., 1969:** Mitochondria and glyoxysomes from *Castor bean* L. endosperm. Enzyme constituents and catalytic capacity. J. Biol. Chem. 244: 3507-3513

**Givan C., 1980:** Aminotransferase in higher plants. The Biochemistry of Plants 5, 329

**Gottlieb L., 1973:** Genetic control AAT isozymes in the diploid plant *Stephanomeria exigua* L. and its allotetraploid derivative. Bioch. Genetics 9, 1

**Gregerson R., Miller S., Petrowski M., Gant J., Vance C., 1994:** Genomic structure, expression and evolution of alfalfa AAT genes. Plant Mol. Biol. 25: 387-399

**Hanning J., Heldt H., 1993:** On the function of mitochondrial metabolism during photosynthesis in spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. Plant Physiol. 103: 1147-1154

**Harris H., Hopkinson D., 1976:** Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North Holland Publishing Co., Amsterdam

**Hart. G., McMillin D., Sears E., 1976:** Determination of the chromosomal location of a AAT structural gene using *Triticum-Agropyron* translocations. Genetics 83: 49-61

**Hart G., 1977:** AAT isozymes of the *Triticinae*. Dissociation and recombination of subunit. Theor. Appl. Genet. 50: 47-51

**Heber U., 1974:** Metabolite exchange between chloroplast and cytoplasm. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 25: 393-421

**Huang A., Liu K., Youle R., 1976:** Organell specific isozymes of AAT in spinach leaves. *Plant Physiol.* 58: 110-113

**Huang A., Liu K., 1977:** Subcellular localization and developmental change of AAT isozymes in the cotyledons of cucumber seedlings. *Plant Physiol.* 59: 777-782

**Leibenguth F., 1974:** Variants of  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase in diploids and triploids of *Drosophila melanogaster*. *Bioch. Genetics* 13,  $\frac{3}{4}$

**Rastogi V., Watson R., 1991:** AAT activity is required for aspartate catabolism and symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 173: 2879-2887

**Reynolds P., Boland M., Blevins D., Shubert K., Randall D., 1982:** Enzymes of amide and ureide biogenesis in developing soybean nodules. *Plant Physiol.* 69: 1334-1338

**Rex P., 1987:** Handbook of plant cytochemistry. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida: 95-105

**Scandalios J., Sorenson J., Ott L., 1975:** Genetic control and intracellular localization of AAT in maize. *Bioch. Genetics* 13, 11/12

**Schubert K., 1986:** Product of biological nitrogen fixation in higher plants. Synthesis, transport and metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37: 539-574

**Schultz C., Coruzzi G., 1995:** The AAT gene family of *Arabidopsis* encodes isoenzymes localized to three distinct subcellular compartments. *The Plant Journal* 7(1): 61-75

**Schultz C., Hsu M., Miesak B., Coruzzi G., 1998:** *Arabidopsis* mutant define an in vitro role for Isoenzymes of AAT in plant nitrogen assimilation. *Genetics* 149: 491-499

**Spector D., Goldman R., Leinwand L., 1998:** Cell a laboratory manual. Vol. 1 Culture and biochemical analysis of cell. Isolation chloroplast from *Pea* tissue.

**Stejskal J., 1994:** Aspartate aminotransferase isozymes in plants: Comparison of two staining methods in polyacrylamide gels. *Biologia Plantarum* 36 (3): 359-364

**Taiz L., Zeiger E., 1991:** *Plant Physiology*. The Benjamin Cummings Publishing Company: 302-307

**Taniguchi M., Kobe A., Kato M., Sugiyama T., 1995:** AAT isozymes in *Panicum miliaceum* L., an NAD-malic enzyme-type C<sub>4</sub> plant: Comparison of enzymatic properties, primary structures and expression patterns. *Arch. Bioch. and Bioph.* 318, 2: 295-306

**Tanksley S., Orton T., 1986:** *Isozymes in plant genetics and breeding*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam

**Tolbert N., Oeser A., Yamazaki R., Hagman R., Kisaki T., 1969:** A survey of plants for leaf peroxisomes. *Plant Physiol.* 44: 135-147

**Totowa N., 1997:** *Methods in molecular biology* 59. Doonan Humana Press Inc. Protein purification protocols.

**Wadsworth G., 1977:** The plant AAT gene family. *Physiologia Plantarum* 100: 998-1006

**Wadsworth G., Gebhardt J., Matthews B., 1995:** Characterization of a soybean cDNA clone encoding the mitochondrial isozyme of AAT. *Plant Mol. Biol.* 27: 1085-1095

**Wadsworth G., Marmaras S., Matthews B., 1993:** Isolation and characterization of a soybean cDNA clone encoding the plastid form of AAT. *Plant Mol. Biol.* 21: 993-1009



**Weeden N., Marx G., 1984:** Chromosomal locations of twelve izozyme loci in *Pisum sativum* L. J. Hered. 78: 153-159

**Voet D., Voet J., 1995:** Biochemistry. John Wiley & Sons, Inc. New York: 549 - 606

**Adresy URL:**

**\*PROGRAM DO ANALIZY ŻELI**

NIH Image: [www.rsb.info.nih.gov/nih-image/](http://www.rsb.info.nih.gov/nih-image/)

**\*PROGRAM DO RYSOWANIA WZORÓW CZĄSTECZEK CHEMICZNYCH:**

[www.prism.gatech.edu/~gte067k/windrawchem/](http://www.prism.gatech.edu/~gte067k/windrawchem/)

**\*TERMINOLOGIA ALLOENZYMÓW:**

[www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/misc/isoen.html](http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/misc/isoen.html) nomenklatura form wielorakich z roku 1976

[www.ucl.ac.uk/~ucbhjow/b241/biochemical\\_2.html](http://www.ucl.ac.uk/~ucbhjow/b241/biochemical_2.html)

**\*INNE STRONY:**

[www.bib.fsagx.ac.be/base/eng/index/v3n1.html](http://www.bib.fsagx.ac.be/base/eng/index/v3n1.html)

[www.bhort.bh.cornell.edu/hort243/molecul/sld004.htm](http://www.bhort.bh.cornell.edu/hort243/molecul/sld004.htm)

[www.users.ox.ac.uk/~dops0022/MMClectures/isoenzymes.pdf](http://www.users.ox.ac.uk/~dops0022/MMClectures/isoenzymes.pdf)

[www.jb.bcosj.or.jp/127-4/4exazjf2.htm](http://www.jb.bcosj.or.jp/127-4/4exazjf2.htm)

[www.mcb.harrard.edu/gilbert/EID](http://www.mcb.harrard.edu/gilbert/EID)

[www.osaka-med.ac.jp/~med012/HomePage/AspT2/AspATe.html](http://www.osaka-med.ac.jp/~med012/HomePage/AspT2/AspATe.html)

**\*KONTAKT:**

[d-artagnan@wp.pl](mailto:d-artagnan@wp.pl)

<http://d-artagnan.webpark.pl/>

0 (prefiks) 22 - 831-21-15 (pon. - pt.)

0 (prefiks) 23 - 672-36-17 (pt. - nd.)