

ALDONA RENNERT

CROWN-GALL — DOŚWIADCZALNY MODEL NOWOTWORU. POCHODZENIE RAKA

Co to jest „crown-gall”

Jedną z charakterystycznych reakcji rośliny wyższej w odpowiedzi na działanie różnych, zakażających ją organizmów, jest tworzenie nienaturalnych, zlokalizowanych rozrostów tkankowych, tzw. narośli. Wiele z nich, np. wyrosła owadzie (galasy) czy brodawki korzeniowe roślin motylkowych, ma charakter ograniczony, co świadczy że anarchia podlega mechanizmom kontroli. Inne natomiast reprezentują rozrost niekontrolowany i nieograniczony. Wśród tych ostatnich można wyróżnić guzowate twory pospolicie zwane rakami [60], które powstają w wyniku zakażenia *Agrobacterium tumefaciens* (Smith and Towns.) Conn. [9, 139] lub według nowszej klasyfikacji [44, 82] *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens*. Jest to powszechnie występująca w glebie, pałeczkowata bakteria z rodziny *Rhizobiaceae*. Dla określenia wywoływanej przez nią choroby roślin, w poszczególnych przypadkach używa się nazw „rak korzeni”, „guzowatość korzeni”, „guzowatość korony” [77], gdyż w naturalnych warunkach rakowacenie występuje najczęściej na korzeniach, a także w koronie drzew.

Bardziej jednoznacznym odpowiednikiem tych nazw, powszechnie przyjętym w światowym piśmiennictwie naukowym, jest anglo-amerykańskie określenie „crown-gall”, nawiązujące do korony (wierzchołka) roślin. Oznacza ono guzowatość (lub guzy) wywoływaną przez tego samego patogena, niezależnie jednak od gatunku czy organu rośliny, na którym rakowacenie jest umiejscowione.

„Crown-gall” ma światowy zasięg; występuje na różnorodnych roślinach uprawnych, ozdobnych i dziko rosnących. Choroba rzadko zabija gospodarza, lecz wywołuje poważne szkody zwłaszcza w szkółkach, sadach i winnicach, przyczyniając się do znacznych strat w produkcji roślinnej [109, 115, 121, 134].

W warunkach doświadczalnych guzowatość można wywołać na roślinach wielu gatunków. Według danych z roku 1951 [52], lista wrażliwych roślin obejmuje przedstawicieli 142 rodzajów, należących do 61 rodzin, w ogromnej większości dwuliś-

ciennych. W bieżącej literaturze można znaleźć informacje donoszące o nowych wrażliwych na „crown-gall” rodzajach i gatunkach roślin [56, 145]. Tak wielki wachlarz gospodarzy, u których *A. tumefaciens* może wywołać patologiczne zmiany, wiąże się z istnieniem dużej liczby tumorogennych szczepów tej bakterii [155]. Choć wykazują one zróżnicowaną zdolność zakażenia poszczególnych gatunków roślin, stopień swoistości względem gospodarzy jest jednak dość niski [3].

A. tumefaciens zakaża rośliny wyłącznie przez zranienia i posiada swoistą zdolność przekształcania normalnych komórek gospodarza w komórki patologiczne. Guzy, które z komórek tych powstają, rozwijają się samodzielnie zarówno w gospodarzu roślinnym, jak i w kulturze tkankowej, bez dalszego udziału patogennej bakterii [36, 156, 157]. Wzrost tkanek naroślowych ma charakter nieograniczony, a same guzy są przeszczepialne [34].

Na podstawie powyższych kryteriów, odpowiadających również nowotworom zwierzęcym uznano, że guzowatość „crown-gall” nie jest zwykłym, stymulowanym przez bakterie rozrostem tkanki, lecz prawdziwym rakiem roślinnym, który powstał w wyniku typowej transformacji nowotworowej. Dlatego, poza względami ekonomicznymi, „crown-gall” od dawna skupia uwagę badaczy z powodu teoretycznych powiązań z ogólnym problemem raka. Ten aspekt zagadnienia został omówiony w kilku artykułach przeglądowych [10, 30, 59].

„Crown-gall” i inne nowotwory roślin

Oprócz „crown-gall”, istnieją jeszcze inne choroby roślin, spełniające kryteria choroby nowotworowej. Wśród nich lepiej poznano guzowatość urazową (wound tumour) Blacka oraz guzowatość wykrytą przez Kostoffa (1930). W inicjacji guza urazowego uczestniczy przenoszony przez owady wirus [12], który zawiera dwuniciowy RNA [162] i polimerazę RNA, odpowiedzialną najprawdopodobniej za replikację własnego genomu wewnątrz komórek [15]. Natomiast tworzenie guzów Kostoffa nie jest związane z żadnym czynnikiem infekcyjnym. Powstają one spontanicznie na roślinach pewnych gatunków, a szczególnie na niektórych międzygatunkowych mieszańcach z rodzaju *Nicotiana*. Przypuszcza się, że za inicjację guzów nowotworowych u hybrydów odpowiedzialne są pewne geny jądrowe, pochodzące od roślin rodzicielskich typu donorowego („+”), podczas gdy różne stopnie ekspresji nowotworowej podlegają genetycznej kontroli przez czynniki występujące w chromosomach gatunków biorczych („-”) [2]. Obszerne przeglądy na temat guza urazowego zostały przedstawione przez Brauna i Stoniera [35] oraz Blacka [13, 14]. Literaturę o rakach Kostoffa zebrał szczegółowo Smith [138]. Mimo różnic etiologicznych, guzowatość „crown-gall”, urazowa i Kostoffa, wykazują wspólne objawy oraz takie same cytologiczne i biochemiczne odchylenia od normy, charakteryzujące niezależny wzrost komórek. Te trzy rodzaje raków roślinnych reprezentują alternatywne systemy badania istoty transformacji nowotworowej oraz autonomii wzrostu. Są to podstawowe problemy onkologii doświadczalnej. Wyrażną zaletę systemów roślinnych stanowi totipotencja komórek. Możliwość

zregenerowania całej rośliny z pojedynczej komórki wegetatywnej pozwala na badania morfogenetycznych aspektów problemu raka i jego powiązanie z różnicowaniem komórkowym [88].

O ile jednak guz urazowy i Kostoffa znajdują pod względem etiologicznym swoje odpowiedniki wśród nowotworów zwierzęcych, szczególne znaczenie „crown-gall” podkreśla fakt, że jest to jedyna znana jak dotąd choroba nowotworowa wywołana przez bakterie. Ponieważ właśnie „crown-gall” — klasyczny model nowotworu roślinnego — najbardziej przypomina raki zwierzęce i ludzkie, wyrażono przekonanie, że bakterie mogą odgrywać rolę również w onkogenezie zwierząt i ludzi [131]. Według wielu danych [41, 42, 70, 104, 130] „crown-gall” reprezentuje naturalny przypadek przekazywania informacji genetycznej z bakterii do komórki roślinnej, dostarczając unikalnej możliwości badań genetycznych o szerszym znaczeniu biologicznym. Dodatkowym walorem modelu „crown-gall” jest również łatwość, z jaką guzy mogą być doświadczalnie wywoływane przez *A. tumefaciens* i otrzymane w formie bakteriologicznie sterylnej.

Przyczyniło się to w dużym stopniu do ogromnej popularności systemu „crown-gall” w badaniach tumorogenezy. Znakomita też większość informacji o autonomicznych guzach roślinnych pochodzi z badania tego szczególnego nowotworu.

Uniwersalność zjawiska nowotworowego

Historii badań „crown-gall” nieodłącznie towarzyszył pogląd o porównywalności tego guza ze złośliwymi nowotworami zwierząt i ludzi [135—137]. Uderzające podobieństwa raków roślinnych i zwierzęcych pozostały do dziś ważnym aspektem badań. Niezmierne bogactwo różnorodnych typów i odmian nowotworów utrudnia wyliczenie wszystkich obserwowanych analogii. Podkreślając rolę autonomicznych guzów roślinnych jako ogólnobiologicznego systemu doświadczalnego, wystarczy jednak wskazać na niektóre podstawowe prawidłowości, odnoszące się do nowotworów zarówno roślinnych jak też zwierzęcych, które przy obecnym stanie wiedzy wydają się dobrze udokumentowane. Można do nich zaliczyć następujące:

Pierwotne uwarunkowanie nowotworu — organizmy muszą wykazywać zdolność reagowania na czynnik rakotwórczy. Warunkiem powstania nowotworu jest przeniknięcie tego czynnika do komórek, a także późniejsza ich zdolność do podziałów. Istotne znaczenie posiada więc okres cyklu życiowego, w jakim komórki wchodzi w styczność z kancerogenem. W systemach roślinnych i zwierzęcych można przytoczyć wyniki świadczące, że czynnik rakotwórczy działa na komórki raczej w fazie syntezy DNA niż podczas mitozy [17, 55, 91, 92].

Wieloletapowość procesu kancerogenezy — w powstaniu nowotworu wyróżnia się dwa zasadnicze etapy: pierwszy, który jest równoznaczny z powstaniem trwałych pierwotnych zmian w niektórych komórkach tkanki wskutek zadziałania na tę tkankę czynnika rakotwórczego i etap drugi, oznaczający rozwój nowotworu, który może się rozpocząć dopiero wtedy, gdy zmienione komórki zostaną pobudzone do

rozmnażania. Pobudzenie następuje pod wpływem hormonów, a także w toku procesu regeneracyjnego. Dlatego stosując substancje zdolne do wzbudzania rozrostów tkankowych o charakterze regeneracyjnym można spowodować promocję tumorów. Substancje takie działają jako czynniki współrakotwórcze (kokancero-geny) [32, 38, 85].

Zjawisko progresji nowotworów — rakowacenie jest procesem postępującym, rozwojowym. U różnorodnych raków zwierzęcych przebieg tego procesu odpowiada najpowszechniej modelowi zmian skokowych, zachodzących kolejno w potomnych generacjach jednej linii komórkowej, u których zaszła zmiana pierwotna. Zmiany te dotyczą różnych cech jednostkowych i prowadzą do coraz większej złośliwości. Jednak wielkość poszczególnych zmian, ich kolejność i czas powstania nie są jednakowe w poszczególnych przypadkach [53, 122]. Odpowiednikiem progresji u raków roślinnych jest stopniowa aktywacja systemów biosyntezy auksyny oraz innych substancji stymulujących wzrost i podziały. W wyniku tych zmian komórki nowotworowe osiągają coraz wyższy stopień autonomii wzrostu [25, 26, 37].

Dziedziczny charakter zmian nowotworowych — zmiany nabyte w każdym stadium rakowacenia przekazują się dziedzicznie podczas podziałów mitotycznych. Po transplantacji *in vivo* i *in vitro* tkanki nowotworowe zachowują przez wiele lat swój patologiczny charakter [54, 156, 157].

Utrata reaktywności na czynniki wzrostu i różnicowania — komórki rakowe nie poddają się działaniu mechanizmów regulacyjnych organizmu macierzystego. Odnaczają się wzrostem pozbawionym funkcji, nietypowym układem, ograniczoną zdolnością różnicowania lub jej brakiem. Nie posiadają funkcjonalnych mechanizmów kontroli wzrostu i rozmnażają się w zasadzie według praw charakterystycznych dla populacji jednokomórkowców [122, 159].

Zmiany właściwości błon — autonomia komórek nowotworowych wiąże się z funkcjonalną modyfikacją błon komórkowych. Komórki raków zwierzęcych charakteryzują się utratą zdolności reagowania na kontakt z innymi komórkami („hamowanie kontaktowe”) [18, 40, 75] oraz zwiększoną przepuszczalnością błon [68, 76]. Zwiększona zdolność pobierania jonów oraz zmiany składu fosfolipidów błon właściwe są również komórkom nowotworów roślinnych [120, 126, 160, 161].

Szeroki zakres stabilnych fenotypów nowotworowych — istnieje wiele morfologicznych i biochemicznych odmian nowotworów indukowanych przez ten sam czynnik rakotwórczy u gospodarzy jednego gatunku, a nawet, szczególnie u zwierząt, na tym samym organie. Autonomia charakteryzująca wzrost nowotworowy wykazuje również wiele stopni. Można znaleźć z jednej strony guzy wolno rosnące i ściśle zlokalizowane, z drugiej natomiast rosnące gwałtownie i tworzące przerzuty. Tworzenie przerzutów u roślin, ze względu na ich swoistość strukturalną, ma jednak zasięg bardziej ograniczony niż u zwierząt; inny jest też mechanizm zjawiska [49, 51]. Szczegółowe informacje o tych aspektach problemu raków roślinnych znajdują się w artykule Brauna i Stoniera [35].

Potencjalna odwracalność stanu nowotworowego — mimo ogólnie występującej stabilności fenotypów nowotworowych, stosując systemy roślinne udało się zademonstrować, że w pewnych warunkach komórki nowotworowe odzyskują zdolność do normalnego wzrostu i rozwoju [27, 129, 149]. Podobne zjawisko rewersji obserwowano również w komórkach raków zwierzęcych i ludzkich [74, 102, 119, 125]. Zagadnienie to zostało szerzej omówione w referatach Brauna [28—30].

Analogie etiologiczne, zbieżności objawów i cech charakterystycznych niekontrolowanego wzrostu w systemach roślinnych i zwierzęcych dały podstawę pogładowi, że mechanizm komórkowy, podlegający działaniu różnorodnych czynników rakotwórczych, jest podstawowym mechanizmem komórek wszystkich organizmów wyższych.

Pojęcie TIP. Koncepcja dwu faz

Podstawowe informacje o tworzeniu guzowości „crown-gall” pochodzą z wcześniejszych prac Brauna [19, 20, 23, 32, 33]. Wprowadził on pojęcie hipotetycznego czynnika indukcji guza — TIP (tumor inducing principle), wytwarzanego przez zjadliwą bakterię „crown-gall” [19]. TIP jest przekazywany komórkom roślinnym i przenosi informację niezbędną dla powstania raka [19, 33]. Zgodnie z aktualną do dziś koncepcją Brauna proces rozwoju prowadzący do uformowania rakowatej narośli przebiega automatycznie, niezależnie od wywołującej ją bakterii; jest on jednak poprzedzany okresem, w którym normalne komórki rośliny, pod wpływem TIP, ulegają przeobrażeniu w komórki nowotworowe (transformacja). Te dwa zasadniczo różne, następujące po sobie, stadia tworzenia guza nowotworowego nazwano fazą zapoczątkowania oraz fazą rozwoju [32]. Warunkiem prawidłowego przebiegu fazy zapoczątkowania jest wystąpienie dwu niezależnych zjawisk określanych jako uwarunkowanie (conditioning) oraz indukcja [20, 23, 33]. Termin „uwarunkowanie” odnosi się do procesów metabolicznych, dzięki którym komórki roślinne stają się wrażliwe na indukcję nowotworu. Natomiast zjawisko indukcji obejmuje interakcję między bakteriami a wrażliwymi (uwarunkowanymi) komórkami rośliny.

Rola zranienia

Zasadniczym warunkiem powstania guza nowotworowego jest zranienie rośliny. Dzięki zranieniu komórki uszkodzonego regionu zostają pobudzone do aktywności mitotycznej. W normalnych warunkach fizjologicznych aktywność ta ustaje wraz z zabliźnieniem rany. Komórki wrażliwe na działanie TIP (komórki uwarunkowane) pojawiają się w regionie zranienia, a stan wrażliwości utrzymuje się przez ograniczony czas [19, 20]. Zmierając do charakterystyki okresu uwarunkowania u *Vinca rosea* Braun zaobserwował [23], że proces uwrażliwiania komórek nasila się stopniowo

po zranieniu łądy, a następnie znika w miarę jak zabliznianie rany zbliża się ku końcowi. Na tej podstawie autor powiązał uwarunkowanie komórek z cyklem zablizniania sugerując, że wrażliwość na działanie TIP mogą wykazywać komórki przygotowujące się do podziału lub znajdujące się w stanie podziału. Sugestie Brauna zostały później potwierdzone w badaniach z roślinami *Kalanchoe daigremontiana* [90, 91]. Z badań tych wypływają następujące wnioski: 1) procesy zablizniania i uwarunkowania są ze sobą skorelowane, 2) stadium maksymalnej wrażliwości gospodarza na transformację występuje przed pierwszym, indukowanym zranieniem podziałem komórkowym, 3) zanikanie stanu wrażliwości towarzyszy tworzeniu się kambium przyrannego, 4) czas trwania stanu wrażliwości komórek na bodziec tumorogenny jak i czas między zranieniem a wystąpieniem pierwszych, ukierunkowanych podziałów komórkowych, zależą od temperatury. W świetle tych wyników [9] trzy fazy cyklu życiowego komórek przed podziałem mogą być wrażliwe na TIP: G_1 , S, G_2 . Istnieją dane, że jest to faza S [17, 39, 89].

Zabliznianie zranień wymaga uaktywnienia pewnych genów rośliny dla wystąpienia zjawiska odróżnicowania komórek wokół rany, które normalnie nigdy się nie dzielą. Przypuszcza się, że jest to związane z syntezą szczególnej frakcji jądrowego DNA (DNA Nh); różni się on od DNA frakcji głównej wyższą zawartością G + C [65, 123]. W przebiegu zjawisk przyrannych obserwowano dwie fale syntezy DNA, poprzedzające pierwsze podziały [92]. W znakowanych radioaktywną tymidyną siewkach grochu, jako pierwszy pojawił się bogaty w G + C DNA satelitarny, a następnie DNA frakcji głównej. Czas pojawienia się obu tych frakcji wskazywał wyraźnie na syntezę satelitarnego DNA w okresie uwarunkowania [39]. Przypuszczalna rola syntezy tego DNA w indukcji „crown-gall” wiąże się z odkryciem stwierdzającym, że między DNA *A. tumefaciens* i jądrowym — ciężkim, satelitarnym DNA, pojawiającym się okresowo w normalnych komórkach roślinnych po zranieniu, istnieją komplementarne sekwencje nukleotydowe [124].

Rola bakterii

Dla wystąpienia zjawiska indukcji nowotworu konieczna jest obecność, w zranionej tkance rośliny, zjadliwych i zdolnych do życia bakterii [19—21, 26]. Nie zasiedlają one komórek roślinnych [71, 103, 126, 142], lecz dzięki chemotaktycznemu poszukiwaniu substancji odżywczych wnikają do przestrzeni międzykomórkowych, przyciągane przez składniki zawarte w soku przyrannym [7, 8]. W tych miejscach bakterie przechodzą okres aktywności metabolicznej [93, 133], a następnie wchodzi w interakcję z przyległymi komórkami rośliny, jeśli uzyskały one stan wrażliwości na TIP. Tak więc zarówno komórki bakterii jak i komórki gospodarza wymagają okresu przygotowania, poprzedzającego indukcję guza. Świadczy to o rodzaju wzajemnej adaptacji, prowadzącej do powstania zależności typu dawca-biorca.

Na podstawie badań z zakażeniami mieszanymi wysunięto wniosek o istnieniu

w zranionych powierzchniach rośliny hipotetycznych miejsc infekcji, o które współzawodniczą komórki zjadliwych i niezjadliwych szczepów *A. tumefaciens* [6, 63, 95]. Potwierdza to zawartą w schemacie tumoryzacji Brauna [35] ideę „miejsc aktywnych”, tworzących się w uwarunkowanych komórkach gospodarza. W tych szczególnych miejscach zranień bakterie łączą się z komórkami rośliny, przy czym liczba miejsc jest ograniczona, a pojedyncze miejsce byłoby dostępne dla pojedynczej komórki bakteryjnej [95]. Wysoka swoistość zjawiska sugerowała występowanie komplementarnych konfiguracji na powierzchniach obu wiążących się partnerów. Trwałe połączenie *A. tumefaciens* ze ścianami komórkowymi rośliny zostało zademonstrowane w mikroskopie elektronowym [16, 116, 141] a występowanie tego zjawiska stwierdzono również w warunkach kultur tkankowych i komórkowych z różnych materiałów roślinnych [97, 107, 116]. Istnieją dane, że w interakcji wiążącej onkogenną bakterię z komórką gospodarza uczestniczą cukrowe składniki (N-acetylo-D-galaktozoamina i β -D-galaktoza) lipopolisacharydów zewnętrznej otoczki bakterii [5, 98, 101, 154] oraz cząsteczki kwasu poligalakturonowego znajdujące się w najbardziej zewnętrznym, bogatym w pektyny regionie roślinnej ściany komórkowej [96, 99]. Jak jednak stwierdzono ostatnio, *A. tumefaciens* wiąże się nie tylko z całymi komórkami roślin *in vitro*, lecz także z ich protoplastami [106], a podczas procesu wiązania bakterie wytwarzają włókienka celulozowe, które przytrzymują je przy powierzchni komórek gospodarza [105, 106]. Tak więc sprawa lokalizacji swoistych receptorów dla onkogennych bakterii jak również mechanizm łączenia się partnerów indukcji „crown-gall” wymagają dalszych badań. Połączenie się bakterii z komórkami gospodarza w miejscach receptorowych jest koniecznym stadium inicjalnym indukcji guza [16, 63, 95]. Poprzedza ono przeniesienie TIP do wrażliwych komórek roślinnych.

W badaniach natury czynnika przemiany nowotworowej (TIP) przełomowe znaczenie posiadało wykazanie, że onkogenne szczepy *Agrobacterium* zawierają duży (112—156 megadaltonów), kolisty, pozachromosomalny element DNA [150, 166], nazwany plazmidem Ti, który może być przekazywany bakteriom szczepów niezjadliwych na drodze koniugacji [62, 72, 83]. Nabycie plazmidu przez komórki niezjadliwe pociągało za sobą pojawienie się zdolności wywoływania guzów nowotworowych dostarczając dowodu, że plazmid Ti jest niezbędny dla ich indukcji [151, 153]. Obecnie przyjmuje się, że w procesie indukcji „crown-gall” następuje przeniesienie z *A. tumefaciens* do komórek roślinnych pewnego segmentu plazmidu Ti (T-DNA), który zawiera informację określającą fenotyp nowotworu. Sekwencje T-DNA są kowalencyjnie związane z jądrowym DNA rośliny [148, 164], utrzymują się [41, 42, 104] i podlegają ekspresji w komórkach guza [61, 66, 110, 165]. Według niektórych obliczeń, w każdej komórce nowotworowej znajduje się około 20 kopii segmentu plazmidu, o masie 3,7—6 megadaltonów, wystarczających dla zakodowania około 10 różnych białek [41]. Szczegółowe informacje o plazmidach *Agrobacterium* i ich roli w tworzeniu nowotworów u roślin oraz w rozwoju roślinnej inżynierii genetycznej można znaleźć w obszernych artykułach przeglądowych [73, 131, 132, 152, 158, 163].

Zjawisko progresji, promocja nowotworów, rola auksyny

Bodziec towarzyszący zranieniu wyzwala w komórkach roślinnych cykl zmian metabolicznych (uwarunkowanie), warunkujących inicjację nienormalnego wzrostu przez czynnik bakteryjny. Jeśli komórki roślinne nie są dostatecznie uwarunkowane, lub jeśli kontakt bakterii z uwarunkowanymi komórkami (indukcja) jest zbyt krótki, guzy się nie tworzą bądź osiągają niższe stopnie przeobrażenia, wyrażające się wolniejszym tempem wzrostu, mniejszymi wymiarami oraz niższym stopniem autotrofii w kulturze tkankowej [19, 21—23, 25, 33]. Świadczy to, że zmiana zainicjowana przez TIP w normalnej komórce roślinnej jest procesem postępującym, w którym cechy charakterystyczne przyszłej komórki nowotworowej akumulują się stopniowo (progresja). W swym typowym przebiegu proces kończy się optymalną transformacją, tzn. powstaniem komórek zdolnych do utworzenia guzów szybko rosnących, całkowicie autonomicznych. Autonomia manifestuje się dzięki trwałej aktywacji kilku systemów metabolicznych, których produkty są niezbędne dla maksymalnej ekspresji wzrostu [25, 26, 37, 160].

Bardzo wolno rosnące guzy można również otrzymać stosując słabo zjadliwe szczepy *A. tumefaciens*. Jednakże pod wpływem dostarczonej z zewnątrz auksyny bakterie te stają się zdolne do wywołania optymalnej transformacji [32, 85, 147]. Badania zostały przeprowadzone na roślinach pomidora, które dla usunięcia naturalnego źródła hormonu pozbawiono wierzchołków i pączków bocznych. Łodygi poniżej miejsc dekapitacji nakłuwano i zakażano bakteriami o słabej wirulencji a na powierzchnię odcięcia wierzchołka nakładano pastę, zawierającą syntetyczną auksynę, IBA lub NAA [32, 147]. Traktowanie obejmowało różne okresy czasu po zranieniu i zakażeniu. Działanie pasty okazało się skuteczne jedynie w okresie indukcji, a wymiary tych sztucznie stymulowanych nowotworów były funkcją czasu ekspozycji na auksynę. Na tej podstawie przyjęto, że auksyna jest niezbędna dla zakończenia procesu transformacji „crown-gall” i pobudzenia przeobrażonych komórek do aktywnej proliferacji. Jest to działanie typowe dla kokarcinogenu [85]. Zgodnie z taką interpretacją, w procesie przeobrażania następującego po okresie uwarunkowania można wyróżnić dwie fazy. W pierwszej z nich (indukcja), normalna komórka roślinna osiąga stan potencjalnej zdolności do niezależnego wzrostu, tworząc tzw. „pierwotną komórkę nowotworową”, w drugiej, wymagającej auksyny, następuje pobudzenie zmienionych komórek do aktywności mitotycznej — jest to faza promocji. Czas trwania tych faz został w przybliżeniu określony dla kilku systemów gospodarz-patogen [20, 23, 84, 90, 91].

Za słuszością rozróżnienia w procesie transformacji „crown-gall” trzech odrębnych faz (uwarunkowanie, indukcja, promocja) przemawiają wyniki badań nad guzami otrzymanymi *in vitro* na krążkach korzenia zapasowego marchwi [84]. Świadczą one o tym, że systemy metaboliczne, uruchamiane kolejno w każdej z tych faz, dotyczą innych produktów. Badania te wskazują również na rolę auksyny w ostatnim okresie przeobrażenia nowotworowego. Zredukowanie endogennego poziomu tego hormonu w czasie fazy promocji przez odpowiednie potraktowanie

zakażonych krążków antyauksyną prowadziło do tworzenia guzów o słabym tempie wzrostu. Efekt hamowania był całkowicie znoszony przy równoczesnym dodaniu auksyny. Jest znamienne, że aktywacja syntezy auksyny w komórkach gospodarza odbywa się również jako jedno z ostatnich zdarzeń cyklu przeobrażania [84].

Choć rola auksyny w transformacji „crown-gall” nie została jednoznacznie wyjaśniona, wnioski o jej udziale w pobudzaniu aktywności mitotycznej przeobrażonych komórek, nie straciły na aktualności w świetle odkrycia, że proces przeobrażenia nowotworowego jest wynikiem przyjęcia przez komórki roślinne obcego, bakteryjnego DNA [41, 148, 164]. Analogicznie do transformacji u bakterii można przyjąć, że wykształcenie mechanizmu podwajania nowego DNA wymaga dłuższego czasu. Komórki bakterii, które przyjęły nowy rodzaj DNA, przez pewien czas dzielą się znacznie wolniej niż komórki niezmienione. Podobnie w „crown-gall”, pierwsze komórki tumorowe dzielą się wolniej niż następne co sugeruje, że rozpoczęcie podziałów komórek, które przeszły indukcję, może być momentem krytycznym dla rozwoju guza i może wymagać szczególnie silnych bodźców hormonalnych. Od dawna wiadomo, że auksyna egzogenna może pobudzić tkanki roślin do nieorganizowanej proliferacji w miejscu zastosowania. Badania reakcji przyrannej w powiązaniu z indukcją „crown-gall” wykazały ponadto, że traktowanie IAA przyspiesza i zwiększa częstotliwość spontanicznych, indukowanych zranieniem podziałów komórkowych [146], co może mieć znaczenie również w zwiększaniu reaktywności tkanki na działanie bakterii.

Źródłem auksyny, niezbędnej w procesie przemiany nowotworowej, może być bakteria chorobotwórcza oraz przylegające tkanki roślinne. Fakt wytwarzania przez *A. tumefaciens* kwasu β -indoliloctowego znano od dawna [1, 11, 79, 144]. Na tej podstawie, korzystny wpływ przedłużonej obecności bakterii w uwarunkowanych zranieniach na tempo wzrostu tumorów wiązano z bakteryjną syntezą auksyny i sugerowano, że słabo zjadliwe szczepy *A. tumefaciens* indukują nowotwory lecz nie są zdolne do wytwarzania auksyny w ilości wystarczającej dla wywołania efektu promocji i (lub) wzbudzenia roślinnej syntezy tego hormonu. Jak później stwierdzono, onkogenne bakterie wytwarzają wielokrotnie wyższe ilości IAA niż bakterie osłabione i niezdolne do indukcji nowotworów a syntezą auksyny w zwiększonej ilości kieruje plazmid Ti [100]. *A. tumefaciens* syntetyzuje oprócz auksyny cytokininę [78, 67, 113] i substancję o aktywności gibereliny [57, 81]. Produkcja bakteryjnych cytokinin jest również funkcją plazmidu Ti [113]. Jednakże dowód wytwarzania przez bakterie hormonów w tkance gospodarza przedstawiono dla auksyny [94] i nie zostały opisane szczepy bakterii wymagające dla pomyślnej indukcji nowotworów innych hormonów. Wyniki najnowszych badań zdają się przesądzać o tym, że zdolność *A. tumefaciens* do syntezy auksyny ma dla indukcji guza decydujące znaczenie. Jak bowiem stwierdzono, gen kierujący syntezą IAA (*iaaP*), zidentyfikowany i zlokalizowany na plazmidzie Ti, jest absolutnie niezbędny w onkogenezie „crown-gall” [101].

Z drugiej strony, młodsze, bogate w hormony części roślin są bardziej wrażliwe na *A. tumefaciens* wskazując, że źródłem czynników wzrostu, wymaganych dla powstania guza są również tkanki roślinne [47, 80]. Także zmienność napotykana w re-

akcji różnych gatunków gospodarzy w odpowiedzi na *A. tumefaciens*, przypisywana jest zmianom wewnętrznego środowiska hormonalnego rośliny żywicielskiej [24, 56, 144]. Można więc sądzić, że wytwarzanie i kontrola poziomu IAA, niezbędnego dla inicjacji i wczesnego wzrostu nowotworu, zależy od swoistego współdziałania między aktywnością lub zdolnością biosyntetyczną komórki roślinnej a plazmidem Ti. Jakkolwiek istota tej współzależności pozostaje niezrozumiała wykazano ostatnio, iż pewne cechy rozwijającej się tkanki „crown-gall” zależą od poziomu jej endogennych hormonów [4] i są kontrolowane zarówno przez czynnik bakteryjny (plazmid Ti) jak przez samą roślinę [64].

Stymulację inicjacji nowotworów można również wywołać stosując — równocześnie z bakteriami — auksynę, cytokininę, giberelinę oraz antagonistów tych hormonów [48, 69, 86, 127]. Jednak wyraźny brak swoistości efektu wskazuje na jego powiązanie z silnym zaburzeniem równowagi hormonalnej i metabolicznej w komórkach gospodarza, co może być sprzyjające lub wymagane do zapoczątkowania nienormalnego wzrostu. W przebiegu tumorigenezy stwierdzono zaburzenia prawidłowego metabolizmu kwasu abscysynowego [87] oraz etylenu [118].

Chociaż powstanie guza (jako proces wzrostu) byłoby niemożliwe bez udziału kilku przynajmniej, różnych regulatorów hormonalnych, znaczenie auksyny (IAA) w zjawisku „crown-gall” wydaje się fundamentalne. Poza swoistym udziałem w przeobrażeniu nowotworowym, jest ona podstawowym czynnikiem autonomii guzów. W procesie transformacji, zróżnicowane komórki roślinne nabywają trwałej zdolności do syntezy czynników wzrostu i podziałów w ilościach znacznie przewyższających poziomy wymagane dla regulacji fizjologicznej [25, 31, 43, 45, 46, 50, 114]. Pozwala im to na uwolnienie się spod kontroli systemów regulacyjnych żywiciela i rozwinięcie cech charakterystycznych dla niezależnego wzrostu. Jednakże spośród kilku czynników warunkujących autonomię tkanek „crown-gall” różnych gatunków roślin [26, 37, 84], jedynie zdolność do syntezy IAA warunkuje ją konsekwentnie [58, 140].

Podsumowanie

Guzowatość „crown-gall”, obserwowana i badana od początku stulecia, jest klasycznym modelem nowotworu roślinnego. Jako system doświadczalny reprezentuje złożone zjawisko ogólnobiologiczne w swej najprostszej postaci. „Crown-gall” to jedyna, znana jak dotąd, choroba nowotworowa, wywoływana przez bakterie.

Onkogenność licznych szczepów *Agrobacterium tumefaciens* zależy od obecności dużych plazmidów — kolistych cząsteczek dwuniciowego DNA. W czasie transformacji nowotworowej część takiego plazmidu przenoszona jest z bakterii do jądra komórki roślinnej, gdzie w postaci zintegrowanej z genomem rośliny utrzymuje się przez czas nieograniczony. Zmiany w funkcjonowaniu komórek roślinnych po transformacji „crown-gall” oraz trwały charakter fenotypu nowotworowego można więc uzasadnić obecnością dodatkowej informacji genetycznej, odtwarzającej się i przekazywanej w trakcie podziałów (hipoteza dodania genów). Istnieją jednak dwie

okoliczności, w świetle których autonomiczny wzrost komórek nie wymaga takiego uzasadnienia. Po pierwsze, stan nowotworowy jest odwracalny, po drugie, fenotyp zbliżony do „crown-gall” pojawia się w kulturze normalnych tkanek bez udziału obcej jednostki genetycznej — zjawisko takie nosi nazwę „anergii”. Tkanki anergizowane, podobnie jak tkanki „crown-gall”, charakteryzują się nieograniczonym wzrostem, autotrofią hormonalną oraz zdolnością nawrotu do stanu prawidłowego. Uwzględniając te okoliczności wysunięto epigenetyczną hipotezę transformacji „crown-gall”, zgodnie z którą czynnik bakteryjny indukuje jedynie zmianę ekspresji genów gospodarza, aktywując normalnie zahamowane zdolności biosyntetyczne komórki roślinnej. Stabilizacja powstałego w ten sposób fenotypu nowotworowego podlegałaby tym samym mechanizmom, dzięki którym następuje stabilizacja ekspresji genów w normalnym rozwoju rośliny. Przy obecnym stanie wiedzy, wykluczenie mechanizmu dodania genów w transformacji „crown-gall” nie wchodzi w rachubę. Istnieją jednak przykłady epigenetycznej regulacji egzogennych genów w komórkach organizmów wyższych. Omówienie doświadczalnych podstaw hipotezy epigenetycznej znajduje się w doskonałych pracach przeglądowych [111, 112].

Tak więc badania „crown-gall” mogą przyczynić się do wyjaśnienia nie tylko kancerogenezy, lecz także mechanizmów kontroli ekspresji genów u roślin wyższych. Wydaje się również możliwe wykorzystanie plazmidów *A. tumefaciens* jako przenośników informacji genetycznej do komórek tych roślin.

LITERATURA

- [1] Abo-El-Dahab M. K., El-Goorani M. A., El-Wakil M. A. 1978. Physiologische Untersuchungen an virulenten und avirulenten Stämmen von *Agrobacterium tumefaciens* aus Ägypten. *Phytopathol. z.* 91:14-22.
- [2] Ahuja M. R. 1968. An hypothesis and evidence concerning the genetic components controlling tumor formation in *Nicotiana*. *Molec. Gen. Genet.* 103:176—184.
- [3] Anderson A. R., Moore I. W. 1979. Host specificity in the genus *Agrobacterium*. *Phytopathol.* 69:320—323.
- [4] Amasino R. M., Miller C. O. 1982. Hormonal control of tobacco crown gall morphology. *Plant Physiol.* 69:389—392.
- [5] Banerjee D., Basu M., Coudhury I., Chatterjee G. Ch. 1981. Cell surface carbohydrates of *Agrobacterium tumefaciens* involved in adherence during crown gall tumor initiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100:1384—1388.
- [6] Beiderbeck R. 1973. Bakterienwand und Tumorinduktion durch *Agrobacterium tumefaciens*. *Z. Naturforsch.* 28C:198—201.
- [7] Beiderbeck R. 1978. Attraktion von *Agrobacterium tumefaciens* durch Pflanzenzellen. *Phytopathol. Z.* 92:184—187.
- [8] Beiderbeck R. 1979. Die Ausbereitung von *Agrobacterium*-Stämmen in Weichagar. *Zbl. Bakt.* II Abt. 134:423—428.
- [9] *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 1957. 7th ed. by Breed, Murray, Smith (London, Baillière, Tindall & Cox.).
- [10] Bergmann I. 1964. Pflanzliche Tumoren und das Krebsproblem. *Naturwiss.* 51:325.
- [11] Bertholet A., Amoreuoux G. 1938. Sur la formation d'acide indol-3-acétique dans l'action de *Bacterium tumefaciens* sur le tryptophane. *C. R. Hebd. Séanc. Acad. Sci.* 206:537—540.
- [12] Black L. M. 1945. A virus tumor disease of plants. *Am. J. Bot.* 32:408—415.
- [13] Black L. M. 1965. Physiology of virus-induced tumors in plants, (w) Ruhland and Lang *Encyclopedia of Plant Physiology* (Springer, New York) s. 236—266.

- [14] Black L. M. 1972. Plant tumors of viral origin. *Progr. Exp. Tumor Res.* 15:110—137.
- [15] Black D. R., Knight C. A. 1970. Ribonucleic acid transcriptase activity in purified wound tumor virus. *J. Virology* 6:194—198.
- [16] Bogers R. J. 1972. On the interaction of *Agrobacterium tumefaciens* with cells of *Kalanchoe daigremontiana*. Proc. III Int. Conf. Plant Pathogenic Bacteria. Wageningen, April 1971 (ed. Pudoc, Wageningen) s. 239—250.
- [17] Bopp M. 1961. Die Bedeutung der DNS für die primäre Zellveränderungen bei der Induktion von Wurzelhalsgallen. *Z. Naturforsch.* 16B:336—347.
- [18] Borek C., Sachs L. 1966. The difference in contact inhibition of cell replication between normal cell and cells transformed by different carcinogenes. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA*, 56:1705—1711.
- [19] Braun A. C. 1943. Studies on tumor inception in crown-gall disease. *Am. J. Bot.* 30:674—677.
- [20] Braun A. C. 1947. Thermal studies on the factors responsible for tumor initiation in crown-gall. *Am. J. Bot.* 34:234—240.
- [21] Braun A. C. 1950. Thermal inactivation studies on the tumorinducing principle in crown-gall. *Phytopathol.* 40:3.
- [22] Braun A. C. 1951. Cellular autonomy in crown-gall. *Phytopathol.* 41:963—966.
- [23] Braun A. C. 1952. Conditioning of the host cell as a factor in the transformation process in crown-gall. *Growth*, 16:65—74.
- [24] Braun A. C. 1953. Bacterial and host factors concerned in determining tumor morphology in crown-gall. *Bot. Gaz.* 114:363—371.
- [25] Braun A. C. 1956. The activation of two growth-substances systems accompanying the conversion of normal to tumor cells in crown-gall. *Cancer Res.* 16:53—60.
- [26] Braun A. C. 1958. A physiological basis for autonomous growth of the crown-gall tumor cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44:344—349.
- [27] Braun A. C. 1959. A demonstration on the recovery of the crown-gall tumor cell with the use of complex tumors of single cell origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 45:932—938.
- [28] Braun A. C. 1965. The reversal of tumor growth. *Scient. Am.* 213:75—83.
- [29] Braun A. C. 1970. On the origin of the cancer cells. *Am. Scientist* 58:307—320.
- [30] Braun A. C. 1972. The relevance of plant tumor systems to an understudying of the basic cellular mechanisms underlying tumorigenesis. *Progr. Exp. Tumor Res.* 15:165—187.
- [31] Braun A. C., Näf U. 1954. A nonauxinic growth-promoting factors present in crown-gall tumor tissue. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86:212—214.
- [32] Braun A. C., Laskaris T. 1942. Tumor formation by attenuated crown-gall bacteria in the presence of growth promoting substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 28:468—477.
- [33] Braun A. C., Mandle R. J. 1948. Studies on the inactivation of the tumor-inducing principle in crown-gall. *Growth* 12:255—269.
- [34] Braun A. C., Morel G. 1950. A comparison of normal, habituated and crown-gall tumor tissue implants in the European grape. *Am. J. Bot.* 37:499—501.
- [35] Braun A. C., Stonier T. 1958. Morphology and physiology of plant tumors. *Protoplasmatologia* 10(5a):1—93.
- [36] Braun A. C., White P. R. 1943. Bacteriological sterility of tissues from secondary crown-gall tumors. *Phytopathol.* 33:85—100.
- [37] Braun A. C., Wood H. N. 1962. On the activation of certain essential biosynthetic systems in cells of *Vinca rosea* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:1776—1782.
- [38] Brenblum I., Shubik P. 1947. A new, quantitative approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse's skin. *Brit. J. Cancer* 1:383—391.
- [39] Broekaert D., Van Parijs R. 1973. Crown-gall genesis in *Pisum sativum* L.: Histological observations and histophotometric DNA measurements. *Mededel. Fak. Landbouwwetensch. Gent*, 38:343—360.
- [40] Burger M. M., Noonan K. D. 1970. Restoration of normal growth by covering of agglutination sites on tumour cell surface. *Nature* 228:512—515.
- [41] Chilton M. D., Drummond M. H., Merlo D. J., Sciaky D., Montoya A., Gordon M. P.,

- Nester E. W. 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown-gall tumorigenesis. *Cell* 11:263—271.
- [42] Chilton M. D., Merlo D. J., Young F. M., Drummond M. H., Garifinkel D. J., Siki R., Nutter R. C., Nester E. W. 1979. Studies on the T-DNA of *Agrobacterium* Ti plasmids. *Rev. Plant Pathol.* 58:109—113.
- [43] Chirek Z. 1979. Comparison of auxin activity in tumorous and normal callus cultures from sunflower and tobacco plants. *Acta Soc. Bot. Pol.* 48:47—53.
- [44] De Ley J., Bernaerts M., Rassel A., Guilmont J. 1966. Approach to an improved taxonomy of the genus *Agrobacterium*. *J. Gen. Microbiol.* 43:7—17.
- [45] Dye M. H., Clark G., Wain R. L. 1962. Investigations on the auxin in tomato crown-gall tissue. *Proc Roy. Soc. London B* 155:478—492.
- [46] Einset J. W. 1980. Cytokinins in tobacco crown-gall tumors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93:510—515.
- [47] El Khalifa M. D., Lippincott J. A. 1968. Quantitative measurements of interaction between crown-gall tumors and the pinto bean hosts. *Am. J. Bot.* 55:382—391.
- [48] El Khalifa M. D., Lippincott J. A. 1968. The influence of plant growth factors on the initiation and growth of crown-gall tumours on primary pinto bean leaves. *J. Exp. Bot.* 19:749—759.
- [49] El Khalifa M. D., El Nur E. E., Lippincott B. B., Lippincott J. A. 1973. Crown-gall on castor bean leaves: II. Formation of secondary tumours. *J. Exp. Bot.* 24:1117—1129.
- [50] El Khalifa M. D., Reish B. I. A. 1975. Estimation of hyperauxinity during tumour formation in castor bean hypocotyls. *Plant Cell Physiol.* 16:681—685.
- [51] El Khalifa M. D., Yousif A. M. 1974. Crown-gall on castor bean leaves: III. Some quantitative aspects of secondary tumour initiation. *Physiol. Plant Pathol.* 4:435—442.
- [52] Elliott C. 1951. *Manual of bacterial plant pathogen.* 2nd ed., revised, Chronica Botanica Co., Waltham, Mass. s. 186.
- [53] Foulds L., 1964. Tumor progression and neoplastic development. (w) Cellular control mechanisms and cancer, ed. Emmelot, Mühlbook (Elsevier, Amsterdam) s. 427.
- [54] Foulds L. 1969. Neoplastic development. Vol. I (Acad. Press, N. Y.).
- [55] Frei J. V., Ritchie A. C. 1964. Diurnal variation in the susceptibility of mouse epidermis to carcinoma and its relationship to DNA synthesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 32:1213—1220.
- [56] Gadgil V. N., Roy K. S. 1961. Studies on crown-gall tumour. I. Host susceptibility to the causal organism, *Agrobacterium tumefaciens* strain B-23. *Trans. Rose Res. Inst.* 24:141—146.
- [57] Galsky A., Lippincott J. A. 1967. Production of a gibberelin-like substance by strains of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 42 (suppl.):29.
- [58] Gautheret R. J. 1941. Sur le repiquage des cultures de tissu d'Endive, de Salsifist et de Topinambour. *C. R. hebd. Séanc. Acad. Sci.* 213:317—318.
- [59] Gautheret R. J. 1964. Les phénomènes tumoraux les plantes: les rapports avec problème du cancer. *Annls Pharm. Fr.* 22:147—150.
- [60] Gäuman E. 1959. *Nauka o infekcyjnych chorobach roślin* (PWRiL, Warszawa) s. 633—645.
- [61] Gelvin S. B., Thomashow M. F., Mc Pherson J. C., Gordon M. P., Nester E. W. 1982. Sizes and map positions of several plasmid-DNA-encoded transcripts in octopine-type crown-gall tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:76—80.
- [62] Genetello C., Van Larebeke N., Holsters M., De Picker A., Van Montagu M., Schell J. 1977. Ti plasmids of *Agrobacterium* as a conjugative plasmids. *Nature* 265:561—563.
- [63] Głogowsky W., Galsky A. G. 1978. *Agrobacterium tumefaciens* site attachment as necessary prerequisite for crown-gall tumor formation on potatoe discs. *Plant Physiol.* 61:1031—1033.
- [64] Gresshoff P. M., Skotnicki M. L., Rolf B. G. 1979. Crown gall teratoma formation is plasmid and plant controlled. *J. Bacteriol.* 137:1020—1021.
- [65] Guillé E., Quétier F., Huguet T. 1968. Étude des acides désoxyribonucléiques des végétaux. Formation d'un ADN nucléaire riche en G + C lors la blessure de certaines plantes supérieures. *C. R. hebd. Séanc. Acad. Sci. D.* 266:837—838.
- [66] Gurely W. B., Kemp J. D., Albert M. J., Sutton D. W., Callis J. 1979. Transcription of Ti

- plasmid-derived sequences in three octopine-type crown gall tumor lines. Proc. Natn. Acad. Sci. USA 76:2828—2832.
- [67] Hahn H. 1976. High-performance liquid chromatography and its use in cytokinin determination in *Agrobacterium tumefaciens* B₆. Plant Cell Physiol. 17:1053—1058.
- [68] Hatanaka M., Hanafusa H. 1970. Analysis of functional change in membrane in the process of cell transformation by *Rous sarcoma* virus; alteration in the characteristic of sugar transport. Virology 41:647—652.
- [69] Häggman J., Kupila-Ahvenniemi S. 1973. Cytokinin activity in normal, wound and crown-gall infected internodes of *Pisum sativum*. Aquilo Ser. Bot. 12:16—20.
- [70] Hernalsteens J. P., Van Vliet F., de Buckeleer M., Depicker A., Engler G., Lemmers M., Van Montagu M., Schell J. 1980. *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid as a host vector system for introducing foreign DNA in plant cells. Nature 287:654—656.
- [71] Hohl H. R. 1961. Über die submikroskopische Struktur hyperplastischer Gewebe von *Datura stramonium* L. Phytopathol. Z. 40:317—356.
- [72] Hooykaas P. I. J., Klapwijk P. M., Nuti M. P., Schilperoort R. A., Rörsch A. 1977. Ex planta transfer of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid to avirulent agrobacteria and to *Rhizobium*. J. Gen. Microbiol. 98:477—484.
- [73] Hooykaas P. I. J., Schilperoort R. A., Rörsch A. 1979. *Agrobacterium* tumor inducing plasmids: Potential vectors for the genetic engineering of plants. (w) Genetic engineering, ed. Setlow, Hollaender (Plenum Publ. Co. N. Y.) 1:151—179.
- [74] Illmensee K., Mintz B. 1976. Totipotency and normal differentiation of single teratocarcinoma cells cloned by injection into blastocysts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:549—553.
- [75] Inbar M., Sachs L. 1969. Structural difference in sites on the surface membranes of normal and transformed cells. Nature 223:710—712.
- [76] Isselbacher K. H. 1972. Increased uptake of amino acids and 2-deoxy-D-glucose by virus transformed cells in culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:585—589.
- [77] Izrailski W. 1962. Bakteryjne choroby roślin. (PWRiL, Warszawa) s. 327—328, 451—476.
- [78] Kaiss-Chapman R. W., Morris R. O. 1977. Trans-zeatin in culture filtrates of *Agrobacterium tumefaciens*. Biochem. Biophys., Res. Commun. 76:453—459.
- [79] Kaper J. M., Veldstra H. 1958. On the metabolism of tryptophan by *Agrobacterium tumefaciens*. Biochim. Biophys. Acta 30:401—420.
- [80] Karsten U. 1965. Über die Abhängigkeit der Tumorentwicklung vom Wirtsorganismus beim bakteriellen Pflanzenkrebs. Kulturpflanze 13:737—761.
- [81] Katznelson H., Cole S. 1965. Production of gibberelin-like substances by bacteria and *Actinomyces*. Can. J. Microbiol. 11:733—741.
- [82] Keane P. J., Kerr A., New P. B. 1970. Crown-gall of stone fruit. II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. Australian J. Biol. 23:585—595.
- [83] Kerr A., Manigault P., Tempe J. 1977. Transfer of virulence in vivo and in vitro in *Agrobacterium*. Nature 265:560—561.
- [84] Klein R. M. 1957. The activation of metabolic systems during crown-gall tumor-cell formation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 43:956—960.
- [85] Klein R. M., Link G. K. K. 1952. Studies on the metabolism of plant neoplasms. V. Auxin as a promoting agent in the transformation of a normal to crown-gall tumor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 38:1066—1072.
- [86] Kupila-Ahvenniemi S., Huhtelin L. 1973. The effect of gibberelic acid on crown-gall development. Aquilo Ser. Bot. 12:21—25.
- [87] Kupila-Ahvenniemi S., Karjalahti L. 1975. The role of abscisic acid in sterile an crown-gall inoculated wounds. Z. Pflanzenphysiol. 76:260—269.
- [88] Kupila-Ahvenniemi S., Therman E. 1968. Morphogenesis of crown-gall. Advances in Morphogenesis. 7:45—78.
- [89] Kupila-Ahvenniemi S., Therman E. 1971. First DNA synthesis around sterile and crown-gall inoculated wounds in *Vicia faba*. Physiol. Plant. 24:23—26.

- [90] Lipetz J. 1965. Crown-gall tumorigenesis. I. Effect of temperature on wound healing and conditioning. *Science* 149:865—868.
- [91] Lipetz J. 1966. Crown-gall Tumorigenesis. II Relations between wound healing and the tumorigenic response. *Cancer Res.* 26:1597—1604.
- [92] Lipetz J. 1967. Wound healing in *Kalanchoe*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 144:320—325.
- [93] Lippincott B. B., Lippincott J. A. Characteristic of *Agrobacterium tumefaciens* auxotrophic mutant infectivity. *J. Bacteriol.* 92:937—945.
- [94] Lippincott J. A., Lippincott B. B. 1968. Auxin and crown-gall tumor initiation. *Phytopathol.* 58:1058—1061.
- [95] Lippincott B. B., Lippincott J. A. 1969. Bacterial attachment to a specific wound site as an essential stage in tumor initiation by *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 97:620—628.
- [96] Lippincott J. A., Lippincott B. B. 1977. Nature and specificity of the bacterium-host attachment in *Agrobacterium* infection. (w) Cell wall biochemistry related to specificity in host plant pathogen interactions, ed. Solheim, Raa (Norway Universitetsforlaget, Oslo) s. 439—451.
- [97] Lippincott J. A., Lippincott B. B. 1978. Cell walls of crown-gall tumors and embryonic plant tissues lack *Agrobacterium* adherence sites. *Science* 199:1075—1079.
- [98] Lippincott J. A., Lippincott B. B. 1980. Microbial adherence, receptors and recognition. ed. Beachey (Chapman a. Hall, London) B 6:375—398.
- [99] Lippincott B. B., Wheatley M. H., Lippincott J. A. 1977. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens* involves attachment of the bacterium to a site on the host plant cell wall. *Plant Physiol.* 59:388—390.
- [100] Liu S. T., Kado C. I. 1979. Indoleacetic acid production: a plasmid function of *Agrobacterium tumefaciens* C 58. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90:171—178.
- [101] Liu S. T., Perry K. L., Schardl C. L., Kado C. I. 1982. *Agrobacterium* Ti plasmid indoleacetic acid generis required for crown-gall oncogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:2812—2816.
- [102] Mackpherson I. 1965. Reversion in hamster cells transformed by *Rous sarcoma* virus. *Science* 148:1731—1733.
- [103] Manocha M. S. 1970. Fine structure of sunflower crown-gall tissue. *Can. J. Bot.* 48:1455—1458.
- [104] Matthyse A. G. 1977. Variation in plasmid DNA sequences present in crown-gall tumor lines. *J. Gen. Microbiol.* 102:427—430.
- [105] Matthyse A. G., Holmes K. V., Gurlitz R. H. G. 1981. Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. *J. Bacteriol.* 145:583—598.
- [106] Matthyse A. G., Holmes K. V., Gurlitz R. H. G. 1982. Binding of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot protoplasts. *Physiol. Plant Pathol.* 20:27—33.
- [107] Matthyse A. G., Wyman P. M., Miller H. L. 1977. Interaction between *Agrobacterium tumefaciens* and tobacco tissue culture cells. *Plant Physiol.* 59:109.
- [108] Matthyse A. G., Wyman P. M., Holmes K. V. 1978. Plasmid-dependent attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to plant tissue culture cells. *Infect. Immun.* 22:516—522.
- [109] Mc Keen W. E. 1954. A study of cane and crown-galls Vancouver Island and a comparison of the causal organisms. *Phytopathol.* 44: 651—655.
- [110] Mc Pherson J. C., Nester E. W., Gordon M. P. 1980. Proteins encoded by *Agrobacterium* Ti plasmid DNA in crown-gall tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2666—2670.
- [111] Meins F. Jr. 1972. Stability of the tumor phenotype in crown-gall tumors of tobacco. *Progr. Exp. Tumor Res.* 15:93—109.
- [112] Meins F. Jr. 1974. Mechanisms underlying the presistence of tumour autonomy in crown-gall disease. (w) Tissue culture and plant science. ed. Street (Acad. Press, London) s. 233—264.
- [113] Messens E., Claeys M. 1979. Ti-plasmid encoded production of cytokinin in culture media of *Agrobacterium tumefaciens*. *Rev. Plant Pathol.* 58: 5647.
- [114] Miller C. O. 1974. Ribosyl-trans-zeatin, a major cytokinin produced by crown-gall tumor tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:334—338.
- [115] Moore L. W. 1976. Latent infections and seasonal variability of crown-gall development in seedlings of three *Prunus* species. *Phytopathol.* 66:1097—1101.

- [116] Ohyama K., Pelcher L. E., Schaefer A. 1979. *In vitro* binding of *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells from suspension culture Plant Physiol. (Bethesda) 63:382—387.
- [117] Owens L. D. 1982. Characteristics of teratomas regenerated *in vitro* from octopine-type crown-gall. Plant Physiol 63:37—40.
- [118] Paterson D. R., Lyle E. W., Earhart D. R. 1975. Crown-gall and ethylene content of rose plants. Hort. Science 10:381.
- [119] Peters N., Fröhlich K. H., Bresching G. 1972. Experimentelle Reversion von Tumorzellen *in vitro*. Experientia 28:319—321.
- [120] Phillips R., Butcher D. N. 1979. Membrane phospholipids of normal and crown-gall callus cultures. Phytochem. 18:791—793.
- [121] Popova I. 1973. The effect of tumors caused by *Agrobacterium tumefaciens* on the growth and development of pear. Gradin. Loz. Nauka 10:45—55.
- [122] Przybora L. A. 1966. Varieties of cancerogenesis. Oncologia 20:39—53.
- [123] Quétier F., Guillé E., Vedel F. 1968. Etude des acides désoxyribonucleiques des végétaux. Isolement et propriétés d'un ADN nucléaire riche en G + C. C. R. hebd. Séanc. Acad. Sci. D 266:735—738.
- [124] Quétier F., Huguet T., Guillé E. 1969. Induction of crown-gall: Partial homology between tumor cell DNA, bacterial DNA and G + C rich DNA of stressed normal cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 34:128—133.
- [125] Rabinowitz Z., Sachs L. 1970. Control of the reversion properties in transformed cells. Nature 225:136—139.
- [126] Radosevich J., Galsky A. G. 1979. The concentration of selected cations in normal and crown-gall tumors obtained from potato discs. Plant Cell Physiol. 20:185—192.
- [127] Rennert A., Korbas L. 1969. Hamowanie tworzenia tumorów chlorkiem chlorocholiny. Acta Soc. Bot. Pol. 38:133—137.
- [128] Ryter A., Manigault P. 1964. Etude au microscope électronique de la formation de tumeurs provoquées par *Agrobacterium tumefaciens* chez le Topinambour. Bull. Soc. Franc. Vég. 10:44—56.
- [129] Sacristan M. D., Melchers G. 1977. Regeneration of plants from habituated and *Agrobacterium*-transformed single cells clones of tobacco. Molec. Genet. 155:111—118.
- [130] Schell J. 1979. The use of Ti plasmid as a vector for the introduction of foreign DNA into plants. Rev. Plant Pathol. 58:5641.
- [131] Schilperoort R. A., Bomhof G. H. 1975. Crown-gall: a model for research and genetic engineering. (w) Genetic manipulations with plant material. ed. Ledoux (Plenum Press, N. Y.) s. 141—162.
- [132] Schilperoort R. A., Kester H. C. M., Klapwijk P. M., Rorsch A., Schell J. 1975. Plant tumors induced by *A. tumefaciens*. A genetic approach. (w) Semaine d'Etude Agriculture et Hygiène des Plantes. ed. Martens (Bull. des Recherches Agronomiques, Gembloux, Belgique) s. 25—35.
- [133] Schmidt R. M., Lippincott B. B., Lippincott J. A. 1969. Growth requirement and infectivity of auxotrophic adenine-dependent mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. Phytopathol. 59:1451—1454.
- [134] Schroth M. N., Weinhold A. R., Mc Cain A. H., Hildebrand D. C., Ross N. 1971. Biology and control of *Agrobacterium tumefaciens*. Hilgardia 49:537—552.
- [135] Smith E. F. 1912. On the some resemblances of crown-gall to human cancer. Science 35:161—172.
- [136] Smith E. F. 1916. Further evidence that crown-gall of plants is cancer. Science 43:871—889.
- [137] Smith E. F. 1925. Cancer in plants and man. Science 61:419—420.
- [138] Smith H. H. 1972. Plant genetic tumors. Progr. Exp. Tumor. Res. 15:138—164.
- [139] Smith E. F., Townsend C. O. 1907. A plant tumor of bacterial origin. Science 25:671—673.
- [140] Sokege A. K., Butcher D. N. 1976. The effect of inorganic nutrients on the hormonal requirements of normal, habituated and crown-gall tissue cultures. J. Exp. Bot. 27:785—793.
- [141] Spiess L. D., Turner J. C., Mahlberg P. G., Lippincott B. B., Lippincott J. A. 1977. Adherence of agrobacteria to moss protonema and gametophores viewed by scanning electron microscopy. Am. J. Bot. 64:1200—1208.

- [142] Stonier T. 1956. Radioautographic evidence for the intercellular location of crown-gall bacteria. *Am. J. Bot.* 43:647—655.
- [143] Stonier T. 1962. Normal, abnormal and pathological regeneration in *Nicotiana*. (w) Rudnick, Regeneration. 20th Symp. Soc. Study of Development (Ronald Press, N. Y.) 20:85—115.
- [144] Sukanya N. K., Vaidyanathan C. S. 1964. Aminotransferases of *Agrobacterium tumefaciens*. Transamination between tryptophan and phenylpyruvate. *Biochem. J.* 92:594—598.
- [145] Süle S., Sass B. 1977. Crown-gall on black currant. *Phytopathol. Z.* 89:366—368.
- [146] Tanimoto E., Douglas C., Halperin W. 1979. Factors affecting gall tumorigenesis in tuber slices of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Plant Physiol.* 63:989—994.
- [147] Thomas J. E., Riker A. J. 1948. The effect of representative plant growth substances upon attenuated bacterial crown-gall. *Phytopathol.* 38:26.
- [148] Thomashow M. F., Nutter R. C., Postle K., Chilton M-D., Blattner F. R., Powell A., Gordon M. P., Nester E. W. 1980. Recombination between higher plant DNA and the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:6448—6452.
- [149] Turgeon R., Wood H. N., Braun A. C. 1976. Studies on the recovery of crown-gall tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:3562—3564.
- [150] Van Larebeke N., Engler G., Holsters M., Van den Elsacker S., Schilperoort R. A., Schell J. 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown-gall-inducing ability. *Nature* 252:169—170.
- [151] Van Larebeke N., Genetello Ch., Schell J., Schilperoort R. A., Hermans A. K., Hernalsteens J. P., Van Montagu M., 1975. Acquisition of tumour-inducing ability by non-oncogenic agrobacteria as a result of plasmid transfer. *Nature* 255: 742—743.
- [152] Van Montagu M., Holsters M., Zambryski P., Hernalsteens J. P., Depicker A., De Beuckeleer M., Engler G., Lemmers M., Willmintzner L., Schell J. 1980. The interaction of *Agrobacterium* Ti-plasmid DNA and plant cells. *Proc. Roy. Soc. London B* 210:351—365.
- [153] Watson B., Currier T. C., Gordon M. P., Chilton M. D., Nester E. W., 1975. Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 123:255—264.
- [154] Wheatley M. H., Spiess L. D. 1977. Role of bacterial lipopolisaccharide in attachment of *Agrobacterium* to moss. *Plant Physiol. (Bethesda)* 60:765—766.
- [155] White L. O. 1972. Taxonomy of the crown-gall organism *Agrobacterium tumefaciens* and its relationship to *Rhizobia* and other *Agrobacteria*. *J. Gen. Microbiol.* 72:565—574.
- [156] White P. R., Braun A. C. 1941. Crown-gall production by bacteria-free tumor tissues. *Science* 94:239—241.
- [157] White P. R., Braun A. C. 1942. A cancerous neoplasm on plants. Autonomous, bacteria free crown-gall tissue. *Cancer Res.* 2:597—615.
- [158] Wichary H. 1982. Plazmidy *Agrobacterium* i ich rola w powstawaniu nowotworów u roślin. *Post. Mikrobiol.* 21:47—63.
- [159] Wood H. N. 1972. The development of a capacity for autonomous growth of the crown-gall tumor cell. *Progr. Exp. Tumor Res.* 15:76—92.
- [160] Wood H. N., Braun A. C. 1961. Studies on regulation of certain essential biosynthetic systems in normal and crown-gall tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 47:1907—1913.
- [161] Wood H. N., Braun A. C. 1965. Studies on the net uptake of solutes by normal and crown-gall tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 54:1532—1538.
- [162] Wood H. A., Streissle G. 1970. Wound tumor virus: purification and fractionation of the double stranded ribonucleic acid. *Virology* 40:329—334.
- [163] Wullems G. J., Marton L., Molendijk L., Krens F., Ooms G., Würzer-Figurelli L., Schilperoort R. A. 1979. Genetic modification of plant cells by transformation and somatic hybridization. (w) *Advances in protoplast research. Proc. 5 th Int. Protoplast Symp., Szeged (Publ. House Hung. Acad. Sci. Budapest)* s. 407—424.
- [164] Yadaw N. S., Postle K., Saiki R. K., Thomashow M. F., Chilton M. D. 1980. T-DNA of a crown-gall teratoma is covalently joined to host plant DNA. *Nature* 287:458—461.

- [165] Yang F., Mc Pherson J. C., Gordon M. P., Nester E. W. 1980. Extensive transcription of foreign DNA in crown gall teratoma. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 92:1273—1277.
- [166] Zeanen I., Van Larebeke N., Teuchy H., Van Montagu M., Schell J. 1974. Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *J. Mol. Biol.* 86:109—127.

Doc. dr hab. Aldona Rennert
Zakład Fizjologii Roślin Uniwersytetu Łódzkiego
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź.