Hamujący wpływ o-aminoazotoluenu na wzrost bezliścienio- wych zarodków rzodkiewki hodowanych *in vitro*

*The inhibiting effect of o-aminoazotoluene on growth of cotyledonless
radish embryos cultivated in vitro*

J. ROGOZIŃSKA

WSTĘP

Prowadząc badania nad wpływem różnych substancji rakotwórczych na rośliny oraz eksplantaty z organów i transplantaty trwałej hodowli tkanek hodowanych *in vitro*, stwierdziłam wybitną zdolność hamowania wzrostu przez o-aminoazotoluen (A), należący do barwników azowych. Wiele węglowodorów aromatycznych o właściwościach rakotwórczych posiada zdolność hamowania wzrostu, chociaż w odniesieniu do roślin nie udało się tego wyraźnie stwierdzić. Również substancje należące do pochodnych aminostilbenu wykazują własności rakotwórcze i są substancjami wysoce antywzrostowymi. W roku 1906 Fischer po raz pierwszy wywołał nowotwory nabłonka na uchu królika przez wstrzyknięcie czerwieni purpurowej (CP). Późniejsze badania wykazały, że działanie rakotwórcze tego barwnika spowodowane jest obecnością w cząsteczce fragmentu o-amidoazotoluenu.

Spośród kilkunastu prac nad działaniem substancji rakotwórczych na rośliny większość wykonana była przez M. Levine'a. Zajmował się on działaniem substancji rakotwórczych takich jak smoły węglowej, CP, 1, 2, 5, 6-dwubenzontracenu (D) na szereg różnych roślin (1934). Zawiesinami eterowymi, pentanowymi lub oliwy oliwkowej o stężeniu od 0,1—10% smarował miejsca aktywnego wzrostu, a roślinom z łodygami dętymi wstrzykiwał roztwór do światła łodyg. Badania wykazały, że smarowanie substancją kancerogeniczną powoduje bujanie tkanek koło miejsca zranienia i smarowanych powierzchni, dając początek zgrubieniu łodygi z małymi, nieregularnymi masami nowej tkanki, a w łodygach dętych obfite podziały wewnętrznej warstwy komórek, wypełniając

całe światło łodygi nową tkanką. Stwierdzona stymulacja spowodowana substancjami kancerogenicznymi jest mniejsza niż bujanie tkanki wywołane przez *Agrobacterium tumefaciens* a tylko nieznacznie większa niż reakcje otrzymane z zastrzykiwaniem amoniaku. Autor wyraża pogląd, że substancje rakotwórcze stosowane na roślinach powodują podział ograniczonej ilości generacji komórek. Kambium i merystem wierzchołkowy rośliny reagują na czynniki kancerogeniczne, a tempo podziału komórek jest zrównoważone przez różnicowanie, z tym że obydwa procesy przebiegają bardzo szybko. W tkankach crown gall natomiast tempo różnicowania jest dużo wolniejsze niż podziały komórek.

W następnej pracy Levine (1936) badał wpływ CP, smoły węglowej i D na wzrost i rozwój korzeni *Allium cepa*. Wierzchołki korzeni poddane ich działaniu zginały się, a przyrost dzienny korzeni był zredukowany. Również ilość powstających korzeni była o połowę mniejsza niż u cebul kontrolnych. Duże zmiany wykazały również badania cytologiczne traktowanych korzeni.

Również Levine'owi udało się wywołać CP tumory na *Kalanchoë* podobne do crown gall (1939). Stosował on równolegle D, metylocholan-tren (M), i benzopiren (B) w 1—2% pastach lanolinowych i 1% eterowy roztwór CP. Zdekapiowane łodygi *Kalanchoë Daigremontiana* traktowane 1% roztworem eterowym CP tworzą po 10—12 dniach obfite korzenie, których większość powstawała z węzła, podczas gdy reszta odciętego międzywęzła wykazywała nieznaczne zgrubienie wokół miejsca ukłucia i styku z pastą kancerogeniczną. Po około 25 dniach na krótkim odcinku międzywęzła powyżej korzeni formowała się mała, gładka, o kształcie kulistym masa wielkości grochu, z której po około 50 dniach wyodrębniały się liczne gładkie struktury, z których rozwijały się pędy i liście, a z niższej części korzenie. Wyrosła te po 6 miesiącach były podobne do crown gall z ulistnionymi łodygami i dużą ilością starych i młodych korzeni. Badania kontrolne z zastosowaniem samej lanoliny nie wykazały żadnej reakcji u *Bryophyllum*, natomiast u *Kalanchoë* rozwinęły się liczne korzonki ponad traktowaną powierzchnią.

W dalszych swych badaniach Levine (1940) porównywał efekty działania substancji kancerogenicznych oraz substancji wzrostowych i *Agrobacterium tumefaciens*. Badał on zmiany morfologiczne i histologiczne wywołane u 21 gatunków roślin przez D, M, B, CP, kwas indolooctowy, chlorowodorek kwasu nikotynowego, sacharozę, tiaminę, ekstrahowane auksyny kwiatów „broccoli“, liści owsa i hodowli *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas rhizogenes* i *Pseudobacterium fasciens*. Substancje kancerogeniczne stosował w stężeniu 1—3% na podłożu uwodnionej lanoliny, z wyjątkiem CP, którą rozpuszczał w eterze.

Zastosowanie 10% roztworu CP w eterze na szczytowym międzywęźlu po dekapitacji u *Kalanchoë Daigremontiana* wywołało guzowate protuberancje przypominające crown gall. Inne kancerogeny, jak D, B i M, spowodowały wystąpienie nekroz na powierzchni zadziałania. U *Kalanchoë Daigremontiana* rozwinęły się korzenie w międzywęźlach poniżej powierzchni smarowania, natomiast nie tworzyły się one u *Bryophyllum calycinum*.

Działanie substancji rakotwórczych: B, M, i A na organizmy jednokomórkowe, a mianowicie drożdże, badał M. N. Meissel (1943). We wszystkich przypadkach stwierdził gromadzenie tych substancji przez mikroorganizmy, które wraz ze wzrostem kolonii było coraz to intensywniejsze, szczególnie duże u form zarodnikujących i substancje te były przekazywane następnym pokoleniom. Stwierdzono, że intensywność fermentacji w hodowlach z M wzrasta o 40%, podczas gdy konsumpcja tlenu zredukowana jest o 26%. Zmiany komórkowe spowodowane A są większe niż wywołane innymi substancjami rakotwórczymi. Subtelny mechanizm tych zmian komórkowych wydaje się zmienny dla różnych substancji kancerogenicznych.

W trwałej hodowli tkanek marchwi *in vitro* Levine (1950) zastosował B, D, i M w stężeniu 10^{-6} do $1,9 \times 10^{-4}$, rozpuszczone w benzenie a CP rozpuszczoną w wodzie w stężeniu 5×10^{-6} lub też w benzenie w stężeniu 10^{-6} . CP nie wykazała działania stymulującego na wzrost tych hodowli ani nie zwiększała czy zmniejszała działania innych kancerogenów.

Działanie substancji rakotwórczych na bezliścieniowe zarodki wyizolowane z nasienia i hodowane *in vitro*, jak wynika z literatury (J. Rappaport 1954), nie było dotąd badane. Technika hodowli zarodków roślinnych jest jedną z ważniejszych metod botaniki doświadczalnej. Znalazła ona między innymi zastosowanie w pracy Friesa (1951), który stwierdził, że większość z 22 badanych przez niego aminokwasów użytych w większych stężeniach hamuje wzrost i rozwój bezliścieniowych zarodków grochu. Również Rappaport, Satina i Blakeslee (1950) podają, że kwas rybonukleinowy jak i ekstrakty tumorów załazkowych bielunia mają hamujący wpływ na wzrost zarodków. Curtis (1947) w badaniach nad wpływem barbituratów na wzrost zarodków storczyków stwierdził, że wiele zarodków na pożywkach zawierających pochodne kwasu barbiturowego tworzyło niezróżnicowane masy komórek zamiast normalnie rozwijających się siewek.

Praca niniejsza jest próbą zastosowania metody hodowli zarodków roślinnych do badań nad działaniem A na wzrost bezliścieniowych zarodków hodowanych *in vitro*. Stwierdzono, że hamuje on wzrost eks-

plantatów z korzenia cykorii, marchwi i bulw korzeniowych topinambura oraz transplantatów trwałej hodowli tkanek marchwi. Eksplantaty nie są idealnym materiałem służącym do porównań wzrostowych. Dlatego zastosowano *A* do transplantatów trwałej hodowli tkanek marchwi, gdzie wykazał proporcjonalne do stężenia zahamowanie wzrostu począwszy już od najmniejszego stężenia 10^{-7} .

Celem tej pracy jest zbadanie, czy i jak będą ujawniały się anty-wzrostowe właściwości *A* zastosowane w hodowli bezliścieniowych zarodków rzodkiewki hodowanej *in vitro*.

MATERIAŁ I METODYKA

Jako materiału doświadczalnego użyto dojrzałych nasion rzodkiewki. Wyselekcjonowane nasiona przeznaczone do wyszczepień sterylizowano powierzchniowo etanolem, a następnie sublimatem, po czym kilkakrotnie płukano sterylną wodą. Pozostawiano je w wodzie na płytkach Petriego przez 18 h w celu spęcznienia, dla łatwiejszej izolacji zarodka z nasienia. Wyizolowane zarodki umieszczano na powierzchni stałej pożywki po 2 w próbówce. Stosowano pożywkę Hellera z pierwiastkami śladowymi,

Tabela 1

Hamujący wpływ *A* na wzrost korzeni i epikotyli bezliścieniowych zarodków rzodkiewki hodowanej *in vitro* (w mm)

Kontrole		10^{-7}		10^{-6}		10^{-5}		10^{-4}		10^{-3}	
k.	e.	k.	e.	k.	e.	k.	e.	k.	e.	k.	e.
70,8	53,4	65,1	52,7	60,0	49,7	52,8	37,2	18,3	13,3	12,2	9,5

k = korzenie

e = epikotyle

ostatnio szeroko używaną w hodowli tkanek roślinnych *in vitro*, z tego względu, że zamierzano porównać wyniki doświadczalne z danymi uzyskanymi z eksplantatami i transplantatami tkanek roślinnych hodowanych również na pożywce Hellera z *A*. Stężenie sacharozy wynosiło 30%, agaru 1%. Pożywkę z *A* przygotowywano opierając się na metodzie Boylanda przygotowywania koloidowych roztworów 1:2:5:6-dwubenzozantracenu, ponieważ *A* rozpuszcza się w wodzie tylko w małych ilościach. *A* rozpuszczano w bezwodnym acetonie przedestylowanym z nad bezwodnego siarczanu sodu, dodawano do ciepłych pożywek, po czym aceton odparowywano na łaźni wodnej. Żelatynę stosowaną w metodzie Boylanda, stanowiącą koloid ochronny dwubenzozantracenu, zastąpiono agarem. Sto-

sowane stężenie A wynosiło od 10^{-7} — 10^{-3} . Zarodki hodowano w inkubacyjnym okresie 7 dni. Hodowlę prowadzono w probówkach o wymiarach $\varnothing 18 \text{ mm} \times 120 \text{ mm}$ z 7,5 ml pożywki, w termostacie o temperaturze 27°C w warunkach bezświatlnych.

Ryc. 1. Wzrost epikotyli i korzeni zarodków (w mm) rosnących w obecności różnych stężeń A
Growth of epicotyls and roots of embryos (in mm) in presence of different concentrations of A .

Na każdej z 6 serii pożywek (kontrolna, 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} A) hodowano 50 zarodków i powtórzono doświadczenie 3-krotnie.

Tabela 2

Procent zahamowania wzrostu zarodków rzodkiewki na pożywce z A

Kontrola	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
0 %	5,16 %	11,68 %	27,54 %	75,00 %	82,53 %

Po siedmiu dniach hodowli siewki wyjmowano z probówek i mierzono długość epikotyli i korzenia, po czym umieszczano w szkiełkach wagowych i razem ważono. Suchą masę oznaczano po wysuszeniu w suszarce w temperaturze 100°C i ostudzeniu w eksykatorze.

Obliczano średnią arytmetyczną każdej z sześciu serii, po czym średnią arytmetyczną z trzech powtórzeń. Wyniki podano w tabeli i na wykresie.

WYNIKI DOŚWIADCZALNE

Wzrost bezliścieniowych zarodków rzodkiewki hodowanej *in vitro* na pożywce Hellera z dodatkiem A został zahamowany. Zahamowanie wzrostu jest proporcjonalne do ilości A w pożywce i ujawnia się już przy najmniejszym stosowanym stężeniu, tj. 10^{-7} , zarówno w stosunku do epikotyli, jak i korzeni.

Dane doświadczalne reprezentuje tabelka 1 podająca średnie arytmetyczne trzech powtórzeń.

Ryc. 2. Świeża i sucha masa epikotyli i korzeni zarodków (w mg) rosnących w obecności różnych stężeń A

Fresh and dry mass of epicotyls and roots of embryos (in mg) in presence of different concentrations of A.

Począwszy od stężenia A 10^{-6} , korzenie na skutek jego osmozy przybierały zabarwienie kremowe, przy stężeniu 10^{-5} posiadały zabarwienie

jasnobrunatne, przy stężeniu 10^{-4} i 10^{-3} korzenie były brązowe, epikotyl zaś wyraźnie pomarańczowy.

Przyrost świeżej i suchej masy zarodków na pożywce z A w stężeniu 10^{-7} jest niemal identyczny z kontrolą. To stężenie nie działa więc jeszcze hamująco na ich przyrost. Począwszy jednak od stężenia 10^{-6} ujawnia się nieznaczne zahamowanie przyrostu świeżej masy epikotyli i suchej masy korzenia, przy czym przyrost świeżej masy korzenia i suchej masy epi-

Tabela 3

Hamujący wpływ A na przyrost świeżej i suchej masy korzeni i epikotyli bezliścieniowych zarodków rzodkiewki hodowanej *in vitro*

	kontrola		10^{-7}		10^{-6}		10^{-5}		10^{-4}		10^{-3}	
	k.	e.	k.	e.	k.	e.	k.	e.	k.	e.	k.	e.
świeża masa mg	20,3	61,6	19,7	62,5	20,2	56,0	12,0	40,1	5,6	12,4	4,6	9,7
sucha masa mg	1,1	2,4	1,1	2,5	0,9	2,4	0,7	2,0	0,6	1,5	0,5	1,3

kotyli pozostaje jeszcze identyczny z kontrolą. Kolejne stężenia zwiększające się o $10 \times$ już obniżają przyrost świeżej jak i suchej masy. Omówione dane doświadczalne przedstawione są w tabeli 3 i na ryc. 2.

Tabela 4

Procent zahamowania przyrostu świeżej i suchej masy zarodków rzodkiewki na pożywce z A

	kontrola	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
świeża masa	o %	+ 0,54%	6,94%	36,43%	77,93%	82,49%
sucha masa	o %	+ 3,41%	5,42%	21,37%	40,46%	48,72%

DYSKUSJA

Dla porównania przedstawionych w pracy wyników doświadczalnych brak zupełnie prac innych autorów.

CP stosowana przez Levine'a na roślinach powodowała nieznaczne bujanie tkanek wokół miejsca zranienia i smarowanych powierzchni. W badaniach nad wzrostem i rozwojem korzeni cebuli CP powodowała zahamowanie wzrostu korzeni, jednak nie wiadomo, w jakim stopniu spowodowane ono było użytymi rozpuszczalnikami. Zastosowana również

przez Levine'a CP na *Kalanchoë* powodowała powstawanie tumorów podobnych do crown gall, czego nie stwierdzono w badaniach kontrolnych z użyciem samej lanoliny, gdzie rozwinęły się tylko liczne korzenie ponad traktowaną powierzchnią.

W badaniach nad wpływem CP na tkanki marchwi hodowane *in vitro* ten sam autor nie stwierdził zwiększenia lub zmniejszenia działania CP na inne kancerogeny ani bezpośredniego wpływu na wzrost tkanek.

Tabela 5

Procent zahamowania wzrostu przez A eksplantatów, transplantatów i bezliścieniowych zarodków

	10^{-4}		10^{-3}	
	świeża m.	sucha m.	świeża m.	sucha m.
eksplantaty: cykorii	29,85%	21,69%	29,72%	22,90%
marchwi	30,17%	30,56%	18,37%	16,67%
topinambura	21,22%	16,85%	30,61%	28,43%
transplantaty: marchwi	73,40%	71,63%	83,70%	79,73%
zarodki: rzodkiewki	77,93%	40,46%	82,49%	48,72%

M. N. Meissel zastosował A w badaniach nad organizmami jednokomórkowymi i obok stwierdzenia gromadzenia A przez komórki drożdży, hipertrofii chondriozomów, zwiększenia intensywności fermentacji, zredukowanej konsumpcji tlenu, nie stwierdził zahamowania wzrostu kolonii przez A.

Przedstawione dane doświadczalne potwierdzają antywzrostowe właściwości A stwierdzone przez autorkę na eksplantatach cykorii, marchwi i topinambura i transplantatach trwałej hodowli tkanek marchwi. Zahamowanie wzrostu w eksplantatach zaczyna się od różnych stężeń A. W przypadku eksplantatów korzenia cykorii wyszczepionych na pożywkę zasadniczą, a po 6 dniach pasażowanych na pożywkę z A, zahamowanie wzrostu w odniesieniu do świeżej masy objawiało się począwszy od najmniejszego stosowanego stężenia, tj. 10^{-7} . W eksplantatach bezpośrednio wyszczepionych na pożywkę z A zahamowanie wzrostu zaczynało się począwszy od 10^{-4} . W eksplantatach marchwi również od stężenia 10^{-4} , a eksplantatach topinambura 10^{-6} . W odniesieniu do suchej masy eksplantatów wyraźne zahamowanie wzrostu stwierdzono przy tych samych stężeniach jedynie u eksplantatów topinambura przy stężeniu $10 \times$ mniejszym, tj. 10^{-5} .

Jak już wspomniano, eksplantaty nie są najlepszym materiałem, o ile chodzi o porównania wzrostowe; mimo że przeprowadzone były na materiale stosunkowo licznym, wyniki są dość rozbieżne.

A zastosowany natomiast w hodowli transplantatów trwałej hodowli tkanek marchwi, mimo że badania przeprowadzone były na szczupłym materiale (po 12 eksplantatów), począwszy od najmniejszego stosowanego stężenia 10^{-7} , powodował proporcjonalne zahamowanie wzrostu do wzrastającego stężenia A.

Procent zahamowania wzrostu przez A stosowany w wyższych stężeniach w odniesieniu do świeżej i suchej masy eksplantatów, transplantatów i bezliścieniowych zarodków rzodkiewki hodowanej *in vitro* przedstawia tabela 5 (J. Rogozińska 1957).

Hamujące właściwości A potwierdzają antywzrostowe właściwości substancji rakotwórczych również w stosunku do roślin. Jednak zdolność hamowania wzrostu posiada również wiele innych substancji nie posiadających właściwości rakotwórczych, nie jest więc to cecha specyficzna.

WYNIKI

1. Wzrost bezliścieniowych zarodków rzodkiewki hodowanej *in vitro* został zahamowany począwszy od najmniejszego stosowanego stężenia, tj. 10^{-7} , a zahamowanie to jest proporcjonalne do ilości o-aminoazotoluenu (A) w pożywce.

2. Zahamowanie wzrostu objawiało się zarówno w stosunku do korzenia, jak i epikotyłu.

3. Przyrost świeżej i suchej masy zarodków wykazał nieznaczne zahamowanie począwszy od stężenia 10^{-6} .

4. Stężenie 10^{-6} nieznacznie hamuje przyrost świeżej masy epikotyłu i suchej masy korzenia.

5. Stężenie 10^{-5} i wyższe wyraźnie hamują przyrost świeżej i suchej masy korzenia i epikotyłu.

Zakład Fizjologii Roślin U. A. M.
w Poznaniu

(Wpłynęło dn. 2.8.1957)

SUMMARY

During the course of research into the influence of carcinogenic substances on plants, isolated plant parts and tissue culture, a marked ability of aminoazotoluene (A) to inhibit growth was ascertained, as distinct from aromatic hydrocarbons. Many carcinogenic hydrocarbons possess anti-growth properties, though it was not possible to confirm this distinctly on plants.

The purpose of this paper is to investigate the effect of the antigrowth properties of A in relation to plant embryos cultivated *in vitro*. It follows