

Analiza wpływu substancji rakotwórczych na strukturę i biochemizm tkanek roślinnych hodowanych *in vitro*

*Analysis of the influence of carcinogenic substances on the structure and
biochemistry of plant tissues grown in vitro*

J. ROGOZIŃSKA

WSTĘP

Po bezowocnych próbach Hana'u'a i innych udało się w 1916 roku Yamagiewie i Ishikawie wywołać nowotwory złośliwe skóry przez wcieranie smoły pogazowej w uszy królika. Od tego czasu datują się badania z zakresu eksperymentalnej kancerologii. Passy w sześć lat później stwierdził, że eterowy wyciąg sadzy również jest rakotwórczy. Te eksperymenty jasno wykazały, że smoła węglowa posiada właściwości rakotwórcze.

Następnym etapem badań było wyizolowanie i zidentyfikowanie poszczególnych składników smoły pogazowej. Okazało się, że substancje rakotwórcze znajdują się w wysoko wrzających frakcjach smoły i należą do węglowodorów aromatycznych. Pierwszymi wyizolowanymi czystymi związkami o wybitnych właściwościach rakotwórczych był 1, 2, 5, 6-dwubenzooantracen (D) i 3, 4-benzopiren (B). Również niektóre barwniki azowe okazały się rakotwórcze.

W porównaniu z bardzo bogatą literaturą zajmującą się działaniem kancerogenów na zwierzęta doświadczalne mało jest prac, bo zaledwie kilkanaście, poświęconych ich działaniu na rośliny. Przypuszczać można, że organizm roślinny w inny sposób będzie na nie reagował. Ponieważ jednak bardzo wiele podstawowych procesów biochemicznych ma podobny charakter tak u roślin jak i zwierząt, dlatego może wydawać się w pewnym względzie uzasadnioną sugestia, że mechanizm ich działania na tkankę roślinną może mieć pewne wspólne ogniwia i reakcje.

Punktem wyjścia do badań wpływu substancji rakotwórczych na rośliny były prace przeprowadzone przez Komuro-Hideo (1931) nad

zmianami cytologicznymi i histologicznymi w wierzchołkach korzeni sievek *Vicia faba* L. i *Pisum sativum* L. traktowanych zawiesinami smoły węglowej. Autor opisał szereg zmian cytologicznych w pobliżu wierzchołka wzrostu jak wakuolizację jądra oraz hyperchromatozę błony jądrowej, aberacje chromosomowe, fragmentację jądra, komórki olbrzymie i hyper- oraz hypochromatyczne, amitotyczny podział komórek oraz zaczątki „brodawkowego” wzrostu korzenia. W wierzchołkach korzeni *Vicia faba* L., których okres ekspozycji na badane substancje był dłuższy, dominującą cechą były hyperchromazja i pyknotyczność jąder. Opisane w tych korzeniach struktury, znalezione w peryblemie powyżej wierzchołka wzrostu, nazwał Komuro-Hideo „Phytoteertumor”. Według autora tumor powstaje przez amitotyczne podziały komórek, przez przemieszczenie specjalnych grup komórek z kalyptrógeny do peryblemu oraz przez histologiczne zmiany w następstwie przzerwania strefy włóśnikowej ryzodermy.

Podobnymi zagadnieniami zajmował się Ortiz Picón (cyt. Levine 1936). Poddawał on korzenie *Allium sativum* L. działaniu smoły i stwierdził obecność splazmolizowanych komórek w pleromie i peryblemie, komórki merystematyczne o 2—3 jądrach, zmiany chromosomowe i w końcu całkowitą dezintegrację jądra. Nie obserwował natomiast żadnych komórek olbrzymich jak i atypowej proliferacji sygnalizowanej przez Komuro-Hideo. Ortiz Picón tłumaczy zmiany komórkowe różnicą ciśnienia osmotycznego powodującego zjawiska plazmolityczne, a nie specyficznym wpływem smoły na korzenie.

Zagadnienie to kontynuował dalej w swych pracach Levine (1936). Badał on działanie smoły węglowej, czerwieni purpurowej (CP) i D na wzrost i rozwój korzeni *Allium cepa* L. Wierzchołki korzeni poddanych działaniu emulsji smoły węglowej względnie działaniu filmu smoły zginęły się, ich przyrost dzienny był zredukowany, a ilość powstających korzeni była o połowę mniejsza niż u cebul kontrolnych. Zdaniem autora toksyczne działanie smoły polegało na hamowaniu podziału komórek, co jest zgodne z obserwacjami Ortiz Picóna i Mottrama (cyt. Levine, 1936).

Badano także działanie smoły węglowej i CP na korzenie uszkodzone przez podłużne zadrapanie, małe ułknięcie koło wierzchołka wzrostu lub przez łagodne zgniecenie. Zachodzą tu dwie różne reakcje. Pierwsza związana ze zranieniem polega na podziale komórek i hipertrofii. Druga prowadzi do zmian w protoplastach komórek pod wpływem użytych do doświadczeń roztworów.

Nieznaczne stymulujące działanie 20-metylocholantrenu (M), B i D na odcięte korzenie grochu wykazał Owen, Weiss i Prince (1939). Większą stymulację wykazały równolegle przeprowadzone doświadczenia

na *Euplanaria dorotocephala*. Stwierdzono, że stymulują one rozmnażanie całych organizmów zwierzęcych i regenerację organizmów z segmentów. Stymulacja wzrostu i regeneracji nie jest jednak specyficzną właściwością kancerogenów.

Kilkanaście lat później badania Levine'a (1951) potwierdziły stymulujący wpływ *B*, *D*, *M* również na wtórne korzenie tworzone przez izolowane fragmenty spichrzowego korzenia marchwi hodowane *in vitro*.

Levine (1934, 1936, 1939, 1940) jako pierwszy zajmował się wpływem substancji rakotwórczych takich jak smoły węglowej, *CP*, *D*, *B*, *M* na całe rośliny i porównywał ich działanie z substancjami wzrostowymi oraz *Agrobacterium tumefaciens*.

Jak wynika z badań, smarowanie substancją kancerogeniczną powodowało bujanie tkanek koło miejsca zranienia i smarowanych powierzchni dając początek zgrubieniu łodygi z małymi, nieregularnymi masami nowej tkanki. Jedynie u *Kalanchoë Daigremontiana CP* wywoływała duże guzowate protuberancje przypominające crown gall, natomiast *D*, *B*, *M* spowodowały wystąpienie nekroz na powierzchni zadziałania. Pod wpływem smarowania substancjami rakotwórczymi wierzchołkowej części łodygi zachodziło zginanie łodyg, rośliny często pozostawały skarłowaciałe a z wierzchołka wyrastały nowe małe pędy przypominające „czarcia miotłę”. Przekroje podłużne smarowanej łodygi wykazały zgrubienie tkanek drewna oraz zwiększenie ilości komórek parenchymatycznych. Smarowanie lub zaszczepienie substancjami kancerogenicznymi roślin z dętymi łodygami powodowało obfity podział wewnętrznej warstwy komórek wyścielających i prowadziło do wypełnienia całego światła łodygi nową tkanką.

Niezależnie od Levine'a Berthelot i Amoureux (1936) badali reakcję słonecznika na substancje rakotwórcze. Biorąc pod uwagę całokształt zmian po zadziałaniu substancją rakotwórczą stwierdzono szczególną toksyczność *D* jak i to, że sposób aplikacji również decyduje o reakcji roślin.

Rarei i Gummel (1939) w badaniach nad wpływem *B* na wzrost tumorów, jako testu dla stwierdzenia jego ogólnego hamującego względnie stymulującego działania, użyli kielkujących ziarniaków jęczmienia i pszenicy. Stwierdzili, że mniejsze stężenia *B* rozpuszczonego w kwasie cholestenosulfonowym stymulują wzrost zielonej masy.

W tym samym czasie podobne badania przeprowadza Kissler i Havas (cyt. Strugger 1940). Stwierdzili oni, że frakcje smoły węglowej, smoły z drewna bukowego i czystego *B*, stosowane na roślinach, zwiększają tempo podziałów komórkowych, bujanie tkanek i powstawanie korzeni przybyszowych, lecz nie obserwowali przy tym nowotworów podobnych do tumorów.

Wybitne zmiany powstałe pod wpływem węglowodorów rakotwórczych w tkankach zwierzęcych nasunęły Goldsteinowi (1937) przypuszczenie, że mogą one także powodować pewne zmiany w organizmach jednokomórkowych. Jako materiału doświadczalnego używał Goldstein bakterii *Escherichia communior* hodowanych na syntetycznej pożywce, do której dodawano węglowodory w stanie koloidowym. Stwierdzono, że *D* i *M* zwiększają tempo podziału komórek w przybliżeniu o 50%, natomiast węglowodór nie posiadający właściwości rakotwórczych — fenantren — nie miał żadnego wpływu.

Niemal równocześnie Dodge i Dodge (1937) badali wpływ *M* na morfologię i wzrost drożdży. Obserwowano szereg odchyień morfologicznych i cytologicznych w hodowlach na różnych pożywkach z *M*. Przyrost suchej masy i fermentacji drożdży hodowanych na pożywce nasyconej *M* wzrósł o 1/3.

Stymulujące działanie *D* na wzrost drożdży wykazał w swych badaniach Cook, Hart i Jolly (1938, 1939). Stwierdzili oni, że dodanie do hodowli drożdży zawiesiny kryształków *D* o odpowiednim stężeniu (9×10^{-4} M) powoduje zwiększenie rozwoju drożdży w przybliżeniu o 50%. Mniejsze jak i większe ilości mają mniejszy wpływ, a ilość czterokrotnie większa jest wystarczająco toksyczna, by zahamować wzrost. Większe stężenia *D* stymulowały oddychanie, podczas gdy niższe aktywne jeszcze w stymulacji wzrostu odpowiednio obniżały oddychanie.

Meissel (1943) badając działanie *A*, *B*, *M* w stanie wodnokoloidowym na hodowle drożdży i saprofityczne bakterie stwierdził gromadzenie tych substancji przez mikroorganizmy.

Zostały tu potwierdzone fakty wystąpienia nowych form dziedzicznych odkrytych przez autora w 1933 roku w przedłużonej hodowli mikroorganizmów na pożywce zawierającej smołę węglową. Zachodzi tu wyraźna zbieżność z omawianymi wyżej wynikami tego samego autora, a uzyskanymi przy eksperymentowaniu z wyodrębnionymi substancjami rakotwórczymi.

Długoletnie badania nad rakotwórczym działaniem smoły na grzyba *Cladosporium herbarum* L. przeprowadzał Skupieński (1952).

Prowadząc badania nad zjawiskami odróżnicowania komórek i mitotycznym działaniem różnych chemikalii Buvał (1942) pierwszy zastosował węglowodory rakotwórcze w hodowli tkanek roślinnych *in vitro*. Jako materiał doświadczalny służyły eksplantaty z korzenia marchwi, składające się z tkanki łykowej i kambialnej, hodowane aseptycznie na agarowej pożywce Knopa. Eksplantaty umieszczano częściowo na kropli oleju rycynowego, w którym był rozpuszczony *B* względnie *M* w stężeniu 0,05% lub wstrzykiwano wymieniony roztwór do tkanki. Autor stwierdził, że eksplantaty marchwi poddane kancerogenom wytwarzały

ostro odgraniczone obfite wybujałości kalusa, podczas gdy kontrolne traktowane samym tylko olejem rycynowym pokryły się pseudoplechą i nie-licznymi małymi naroślami kambium.

Kilka lat później analogiczne badania na trwałej hodowli tkanek marchwi przeprowadził Levine (1950). Kancerogeny: B, D, M oraz CP rozpuszczano w benzenie i dodawano do pożywki.

W innej pracy M. Levine (1950) przedstawia zmiany cytologiczne tkanki marchwi hodowanej *in vitro* wywołane kancerogenami i substancjami wzrostowymi.

Zastosowanie D, B i M w stężeniu 10^{-6} do 5×10^{-5} przez tego samego autora (1950) na tkankach słonecznika i tytoniu hodowanych *in vitro* wykazało, że zwiększają one wzrost korzeni i podtrzymują wzrost masy tkankowej. Badania histologiczne nie wykazały obecności atypowych komórek stwierdzonych przez Levine'a w hodowlach tkanek marchwi.

W wyniku dotychczasowych badań stwierdzono, że substancje rakotwórcze w odniesieniu do mikroorganizmów modyfikują intensywność fermentacji i oddychania, wywołują zmiany morfologiczne, przy czym działają na nie stymulująco. W hodowli tkanek roślinnych *in vitro* stosowane nawet w dużych stężeniach nie wykazały działania toksycznego. Zastosowane w miejscach szczególnie intensywnego wzrostu na roślinach, oprócz obserwowanej często nieznacznej stymulacji, wywołują nekrozy i przedwczesne usychanie pędów. Proliferacja wywołana przez te czynniki jest reakcją ochronną rośliny. Obserwowane przez różnych autorów zwiększenie tempa podziału komórek, stymulacja wzrostu, bujanie tkanek, powstawanie korzeni przybyszowych nie jest specyficzne dla substancji rakotwórczych i nie ma w sobie cech tzw. „złośliwości“, a jest tylko przejawem odmiennych od normalnych możliwości wzrostu roślin.

Pierwsze prace z zastosowaniem metody hodowli tkanek *in vitro* do badania działania substancji rakotwórczych na eksplantaty izolowane z korzenia marchwi przeprowadzone przez Buva'ta (1942) ograniczały się do obserwacji morfologicznych. Badania Levine'a (1950, 1951) przeprowadzone na tkankach traktowały ten temat głównie od strony cytologicznej i anatomicznej. Nie badano natomiast działania substancji rakotwórczych na tkanki hodowane *in vitro* pod względem fizjologicznym.

Celem podjętej pracy jest więc ogólna charakterystyka fizjologiczna, szerzej uwzględniająca procesy wzrostu eksplantatów jak i tkanek na różnych pożywkach z węglowodorami aromatycznymi oraz z o-aminoazotoluenem, porównanie ich intensywności oddychania jak i aktywności kilku enzymów, gdyż podobne zagadnienia od szeregu lat są przeprowadzane na tkankach zwierzęcych.

MATERIAŁ I METODYKA

W badaniach nad działaniem substancji rakotwórczych na całe rośliny użyto słonecznika (*Helianthus annuus* L.). Wysiewano go na początku maja (6.V.1955) w Ogrodzie Botanicznym UP. Po dwóch miesiącach, po osiągnięciu około 0,5 m traktowano je substancjami rakotwórczymi. Smarowano je 1% pastą lanolinową z M i A, natomiast rośliny kontrolne tylko uwodnioną lanoliną. Metoda polegała na smarowaniu wierzchołka łodygi po dekapitacji pierwszego i drugiego międzywęzła, ogonków liściowych również z pierwszego i drugiego węzła na powierzchni 1×2 cm, po uprzednim usunięciu zewnętrznych tkanek wraz z łykiem. Smarowanie powtórzono po trzech tygodniach. Przed ewentualnym splukaniem past przez deszcze zabezpieczono traktowane miejsca daszkami z cynfolii.

W drugiej serii doświadczeń przeprowadzono badania na słonecznikach w nieco późniejszej fazie wzrostu. Słoneczniki w hodowlach wazonowych hodowano w hali wegetacyjnej W. S. R. Sposób zastosowania, rodzaj i stężenie past było takie samo jak w poprzednim doświadczeniu.

Dokładniejsze badania przeprowadzono z zastosowaniem metody hodowli tkanek *in vitro*, gdyż metoda ta jest szczególnie dogodną, ponieważ pozwala analizować wpływ różnych czynników bezpośrednio, bez ingerencji stosunków korelacyjnych, na które jest wystawiona tkanka roślinna *in situ*. Jako materiał doświadczalny służyły eksplantaty z korzenia marchwi (*Daucus carota* L.) i cykorii (*Cichorium intybus* L.) oraz bulwy korzeniowe topinambura (*Helianthus tuberosus* L.). Ponieważ dotychczasowe badania cytologiczne, anatomiczne i morfologiczne przeprowadzono na eksplantatach z korzenia marchwi oraz na tkankach marchwi hodowanych *in vitro*, badania niniejsze przeprowadzono na tymże materiale celem porównania wyników. Dla prześledzenia wpływu substancji rakotwórczych na eksplantaty i tkanki wymagające w przeciwieństwie do tkanek marchwi obecności heteroauksyny w pożywce, zastosowano eksplantaty i tkanki topinambura oraz eksplantaty cykorii, charakteryzujące się dużą zdolnością regeneracyjną. Materiał do wyszczepień pierwotnych sterylizowano powierzchniowo 40 min. w 2% sublimacie, po czym płukano sześciokrotnie sterylną wodą. W doświadczeniach początkowych do analiz anatomicznych wycinano graniastosłupy tkanki, o wymiarach w przybliżeniu $0,5 \times 0,5 \times 1,5$ cm, w późniejszych zaś do oznaczania świeżej i suchej masy zastosowano metodę dokładniejszą wycinając eksplantaty korkoborem o średnicy 0,5 cm i krajano je na papierze milimetrowym na odcinki o długości 1 cm. Izolacja eksplantatów prowadzona była w warunkach aseptycznych.

Z korzenia marchwi wycinano w niektórych doświadczeniach tylko tkankę łykową, w innych łyko wraz z kambium. Z bulw korzeniowych topinambura brano jedynie miękisz drzewny. Ponieważ kambium przebiega w korzeniu cykorii linią falistą, nie uwzględniano rodzaju wycinanej tkanki, łyka, drewna czy kambium, tak że poszczególne eksplantaty składały się z tkanek przypadkowych.

Pierwotne eksplantaty marchwi wyszczone w położeniu odwróconym rozwijają na morfologicznie dolnym biegunie obfite masy zielonego kalusa i białej pseudoplechy. Izolowany kalus po przeszczepieniu daje początek trwałej hodowli tkanek korzenia marchwi.

Eksplantaty topinambura charakteryzują się obfitym wzrostem części eksplantatu zanurzonej w pożywce. Powstaje tam wyraźny pas kambium po odróżnicowaniu dojrzałych już i wyspecjalizowanych komórek, na zewnątrz którego odkładane są nowe pokłady komórek.

Cykoria posiadająca w ogóle dużą zdolność regeneracyjną zachowuje ją również w hodowli *in vitro*. Już po kilku dniach po wyszczeniu eksplantaty tworzyły obfite korzenie i pączki, z których rozwijały się liście.

Przeprowadzono także doświadczenia na transplantatach trwałej hodowli tkanek marchwi i topinambura *in vitro*.

Tkanka marchwi została wyizolowana w 1939 r. przez Gauthereta. Tkanę topinambura wyizolowano w 1953 r. w Zakładzie Fizjologii Roślin UP.

Tkanka marchwi „przyzwyczajona” do heteroauksyny (*l'accoutumée à l'hétéroauxine*) według terminologii Gauthereta nie reaguje na substancje wzrostowe i wymaga do swego nieograniczonego wzrostu jedynie soli mineralnych, organicznego źródła węgla i agaru dla zestalenia pożywki. W przeciwieństwie tkanka topinambura wymaga do swego nieograniczonego wzrostu dodatku heteroauksyny do pożywki.

Hodowla tkanek

W początkowych doświadczeniach dla tkanek marchwi i topinambura stosowano pożywkę zasadniczą Knopa (1/2 konc.) z glukozą, potem zastąpiono ją pożywką Hellera z sacharozą.

Pożywka Hellera

KCl	750 mg
NaNO ₃	600 „
MgSO ₄ 7H ₂ O	250 „
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	125 „
CaCl ₂ 2H ₂ O	75 „
Pierwiastki śladowe:	
FeCl ₃ 6H ₂ O	1 „
ZnSO ₄ 7H ₂ O	1 „

Pożywka Knopa

Ca(NO ₃) ₂	500 mg
KNO ₃	125 „
KH ₂ PO ₄	125 „
MgSO ₄ 7H ₂ O	125 „
Pierwiastki śladowe według Berthelota:	
Fe ₂ (SO ₄) ₃	25 mg

Pożywka Hellera			Pożywka Knopa		
H ₃ BO ₃	1 mg		MnSO ₄ 7H ₂ O	1 mg	
MnSO ₄ 4H ₂ O	0,1		KJ	0,25	
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,03		FeSO ₄	0,1	
AlCl ₃	0,03		ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,05	
NiCl ₂ 6H ₂ O	0,03		BeSO ₄ 4H ₂ O	0,05	
KJ	0,01		NiCl ₂ 6H ₂ O	0,025	
			CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025	
H ₂ O	1000	ml	CuSO ₄ 5H ₂ O	0,025	
agar	10	g	H ₃ BO ₃	0,025	
sacharoza:			H ₂ SO ₄ c. wł. (d) 1,84	0,0005	ml
(dla tkanek marchwi)	20	„	H ₂ O	1000	„
(„ „ topinambura)	60	„	agar	10	g
kwas α-naftalenooctowy	5x10 ⁻⁷		glukoza:		
(dla tkanek topinambura)			(dla tkanek marchwi)	15	„
			(„ „ topinambura)	40	„
			kwas α-naftalenooctowy	5x10 ⁻⁷	
			(dla tkanek topinambura)		

Eksplantaty marchwi i cykorii hodowano na pożywce z dodatkiem kwasu β-indolooctowego w stężeniu 5×10^{-8} g/l, a topinambura z kwasem α-naftalenooctowym w stężeniu 5×10^{-7} g/l.

Tkanki hodowano w probówkach o średnicy 2,2 cm i dł. 11,5 cm, do których wlewano 12,5 ml pożywki. Pożywki sterylizowano 20 min. pod nadciśnieniem 0,5 atmosfery. Probówki zamykano zatyczkami z waty, po czym owijano celofanem. Przeszczepień tkanek dokonywano co 8 tygodni. Hodowle prowadzono w specjalnym pokoju hodowlanym.

Dla każdego doświadczenia przeprowadzono 12—48 równoległych hodowli.

Zastosowanie chemicznych substancji rakotwórczych

Ponieważ węglowodory aromatyczne są związkami hydrofobowymi, zastosowanie ich w odpowiedniej formie w pożywce, łatwej do pobrania przez tkanki, natrafiało na trudności. Aby lepiej udostępnić je tkankom, zastosowano je w niniejszej pracy również w stanie koloidowym, nie stosowanym dotąd w hodowli tkanek roślinnych.

Zakres stężenia stosowanych substancji rakotwórczych o-aminoazotoluenu (A), 3, 4-benzopirenu (B), 1, 2, 5, 6-dwubenzooantracenu (D) i 20-metylocholantrenu (M) wynosił od 10^{-7} — 10^{-3} g/l.

W odniesieniu do eksplantatów marchwi i topinambura stężenie D rozpuszczonego w benzenie i dodanego do pożywki bezpośrednio przed rozlaniem do probówek wynosiło 2×10^{-4} , 5×10^{-4} , 10^{-3} g/l. W czasie sterylizacji benzen ulatniał się, a D wykrystalizowywał częściowo na brzegach probówek i zatem rozproszenie jego w pożywce nie było zupełnie równomierne. Z tego względu zastosowano później inną metodę.

W następnych seriach doświadczeń stosowano miejscowo *M* w stężeniu 5×10^{-5} i 2×10^{-4} rozpuszczony w oleju rycynowym, pipetując kroplę na górną powierzchnię eksplantatu, względnie w uwodnionej lanolinie, przy czym smarowano górną względnie boczne powierzchnie eksplantatu. Stosowano również *D* i *M* w różnych kombinacjach z kwasem α -naftalenoctowym i β -indolooctowym.

Eksplantaty w tych seriach doświadczeń wycinane były skalpelem i służyły głównie do obserwacji morfologicznych i badań anatomicznych.

W innych seriach eksplantaty wycinano korkoborem i wyszczepiano na pożywkę zasadniczą, po czym po 6 dniach przenoszono na pożywkę z substancjami rakotwórczymi po dwa do każdej próbówki. *A*, *B*, *D* i *M* rozcierano dokładnie w mózdzierzu agatowym, następnie dodawano zestalonej pożywki i ponownie ucierano. Po sterylizacji bezpośrednio przed przeszczepieniem pipetowano do każdej próbówki na powierzchnię zestalonej pożywki zasadniczej 2 ml pożywki z jednym z kancerogenów w stężeniu 5×10^{-4} . Ciepłą, płynną pożywkę przed każdym pipetowaniem można było dokładnie wymieszać, tak że rozproszenie substancji rakotwórczych było zupełnie równomierne. Metoda ta jest również bardzo oszczędna, gdyż substancja rakotwórcza znajduje się tylko w powierzchniowej warstwie pożywki, w której umieszczony jest eksplantat.

W trwałej hodowli tkanek marchwi i topinambura stosowano również substancje rakotwórcze w stężeniu 5×10^{-4} , podobną techniką jak wyżej, z tą różnicą, że wystarczał 1 ml pożywki z substancją rakotwórczą do umieszczenia transplantatu. Ze względu na to, że *A* nie pozostawał w górnej 1 ml warstwie jak *B*, *D* i *M*, lecz dyfundował do niższych partii pożywki, w następnych doświadczeniach rozpuszczano go w bezwodnym acetonie przedestylowanym znad bezwodnego siarczanu sodu i dodawano do pożywek bezpośrednio przed rozlaniem do próbówek przed sterylizacją.

Później zmieniono postępowanie również w stosunku do *B*, *D* i *M* otrzymując koloidowe roztwory kancerogenów metodą Boylanda z tą różnicą, że żelatynę, która stanowi ich koloid ochronny, zastąpiono agarem, gdyż na płynnej pożywce żelatynowej po kilku dniach po jej wyschnięciu następowało wytrącenie *D* wokół tkanki. Poza tym tkanki na pożywce żelatynowej gorzej rosły niż na pożywce agarowej. Również zastosowanie żelatyny wraz z agarem dawało roztwór bardziej heterogeny niż użycie samego agaru. Stężenie substancji rakotwórczych wynosiło od 10^{-7} — 10^{-3} g/l.

Próby zastosowania kofeiny według H. Weil-Malherbe (1946) jako związku ułatwiającego rozpuszczanie substancji rakotwórczych nie dały pozytywnych wyników z tego względu, że na pożywce z kofeiną w różnych stężeniach wzrost tkanek marchwi jest wybitnie zahamowany,

poza tym następował rozkład chlorofilu tak, że tkanki stawały się bezbarwne i szkliste.

Badania anatomiczne

Eksplantaty marchwi i topinambura do badań anatomicznych utrwalano w płynie Bouina przy użyciu pompy próżniowej dla jego równomiernego przenikania, po czym zatapiano w parafinie i krajano mikrotomem na 15μ skrawki. Barwiono błękitem metylowym.

Oznaczanie świeżej i suchej masy

Po ośmiu tygodniach hodowli eksplantaty względnie transplantaty wyjmowano z probówek i ważono każdy oddzielnie na małej wadze uchyłnej z dokładnością do 10 mg.

W celu oznaczenia suchej masy suszono tkanki w suszarce w temperaturze 105°C przez 24 godziny, po czym ważono z dokładnością do 1 mg.

Obliczano średnią arytmetyczną świeżej i suchej masy oraz średni błąd średniej arytmetycznej.

Pomiar intensywności oddychania

Intensywność oddychania badano w aparacie Warburga. Tkanki krajano mikrotomem ręcznym na skrawki grubości 0,5 mm, następnie płukano 14 godzin w wodzie bieżącej, po czym dwukrotnie w wodzie destylowanej, osuszano bibułą, szybko ważono i przenoszono do naczynek manometrycznych z substratem oddechowym. Płukanie usuwa substancje organiczne z przeciętych komórek i eliminuje pewne nierówności w oddychaniu częściowo związane z krajaniem tkanek. Pojemność naczynek manometrycznych wynosiła od 15—20 ml. W każde naczynko pipetowano 3,5 ml buforu fosforanowego o pH 5,59 zawierającego 2% glukozy oraz dawano 1 g tkanki marchwi i przeprowadzano równoległe pomiary z tkankami kontrolnymi i z tkankami hodowanymi na pożywkach z A, B, D i M rozpuszczonych przy pomocy acetonu i D w stężeniu 5×10^{-4} w stanie krystalicznym.

Tkanki topinambura odważano po 250 mg i przeprowadzono również równoległe pomiary z tkankami kontrolnymi i hodowanymi na pożywce z D w stężeniu 5×10^{-4} .

Odczytów stanu manometru dokonywano co 10 min. przez okres 1 godziny. Wyniki przeliczano na 1 g świeżej i suchej masy. Po zakończeniu doświadczenia tkanki wyjmowano z naczynek manometrycznych, płukano w wodzie destylowanej, osuszano bibułą, po czym suszono przez

24 godz. w temperaturze 80°C. Przy obliczeniach przyjmowano, że 1 g tkanki odpowiada objętości 1 ml.

Aktywność fosfataz

1 g tkanki marchwi rozcierano z piaskiem kwarcowym i 3 ml buforu octanowego o pH 5,6. Następnie przenoszono do probówki wirówkowej, przy czym mózdzierz i tłuczek splukano 4 ml buforu i odwirowywano 5 min. przy 3000 obrotów. Po zlaniu płynu znad osadu do 25 ml kolbek miarowych dodawano 5 ml 4% fosfoglicerynianu potasu jako substratu, po czym dopełniano buforem do miarki. Po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 35°C brano do analizy 0,5 ml zaczynu, co odpowiada 20 mg tkanki i z różnicy t_{24} i t_0 obliczano przyrost fosforu nieorganicznego metodą Fiske i Subbarowa. Zasada tej metody polega na reakcji kwasu molibdenowego w kwaśnym środowisku z kwasem ortofosforowym, w wyniku której powstaje kwas fosforomolibdenowy. W obecności czynnika redukującego ejkonogenu (kwas 1- α -amino-2-naftolo-4-sulfonowy) kwas fosforomolibdenowy daje zredukowany związek o barwie niebieskiej. Intensywność niebieskiej barwy, która jest proporcjonalna do zawartości kwasu fosforowego w roztworze, mierzono fotoelektrycznym kolorymetrem Langego.

Badano równolegle tkanki hodowane na pożywce kontrolnej i na pożywce z D w stężeniu 5×10^{-4} . Każdy pomiar powtórzono pięciokrotnie.

Aktywność katalaz

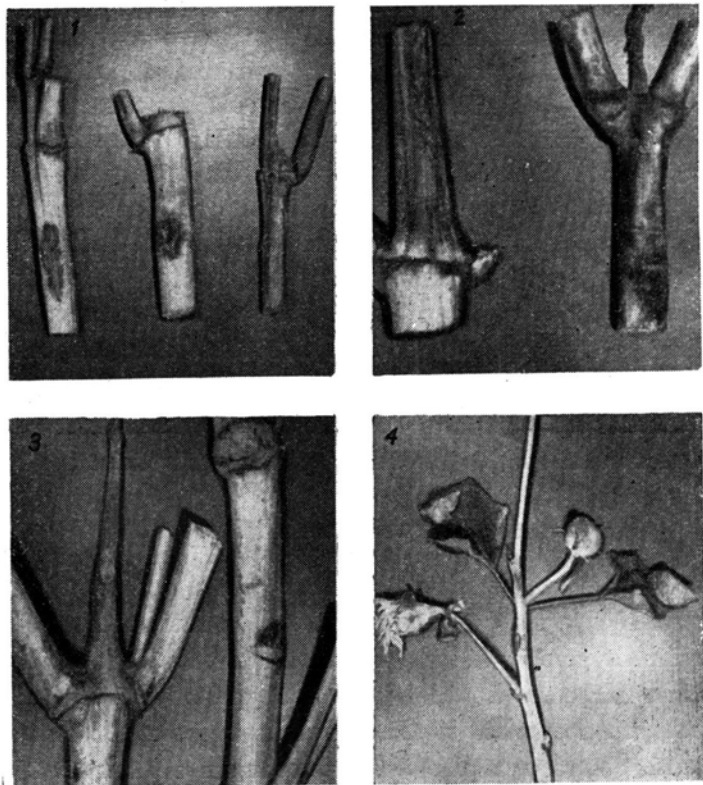
Aktywność katalaz oznaczano mierząc ilość rozłożonej wody utlenionej. Wydzielający się przy tym tlen oznaczano gazometrycznie. Wypiera on z biurety wodę, której poziom stopniowo się obniża. Pomiaru ilości wydzielającego się tlenu wykonywano periodycznie w ciągu całego doświadczenia, co pozwalało śledzić kinetykę procesu. Do oznaczeń brano po 2 g tkanki, ucierano z piaskiem kwarcowym i 0,1 g CaCO_3 , uzupełniano wodą do 50 ml, po czym inkubowano 4 godziny w temperaturze pokojowej. Do naczynia reakcyjnego pipetowano 5 lub 10 ml zaczynu, co odpowiada 0,2 lub 0,4 g tkanki, a w drugie ramię 1–2 ml wody utlenionej, w zależności od jej miana, które oznaczano przed każdą analizą miareczkując ją 0,1 n KMnO_4 . Naczynie wraz z mieszaniną zaczynu i wody utlenionej równomiernie wstrząsano przez cały czas trwania doświadczenia.

Aktywność katalaz wyrażano w mililitrach tlenu na określoną jednostkę ciężaru (2 g) badanej tkanki.

WYNIKI DOŚWIADCZALNE

1. Działanie substancji rakotwórczych na całe rośliny

Po sześciu miesiącach wzrostu słoneczników stwierdzono jedynie zgrubienia w miejscu zranienia i zadziałania pasty, będące sumą efektu mechanicznego i użytej pasty oraz zgrubienie łodyg u podstawy węzłów. Wierzchołki łodygi po dekapitacji i smarowaniu pastami z A i M często ciemniały i usychały.



Ryc. 1. *Helianthus annuus* L. 1 — kontrola; 2—4 — efekt działania 1% A i M w paście lanolinowej: 2 — A; 3 — M; 4 — M

Helianthus annuus L. 1 — control; 2—4 — effect of 1% A, M in lanolin: 2 — A; 3 — M; 4 — M

W drugiej serii doświadczeń stwierdzono zmiany podobne, chociaż nie-
zbyt wyraźne, gdyż rośliny w hodowli wazonowej nie osiągnęły tak buj-
nego wzrostu. Poza tym obserwowano zmiany teratologiczne w koszycz-
kach jednego słonecznika.

2. Działanie substancji rakotwórczych na eksplantaty i transplantaty trwałej hodowli tkanek *in vitro*

a) Obserwacje anatomiczne

Zastosowanie *D* o stężeniu 2×10^{-4} w stanie krystalicznym w pożywce do eksplantatów marchwi i topinambura nie dało wyraźniejszych różnic w porównaniu z eksplantatami kontrolnymi. Również smarowanie bocznych lub górnych powierzchni eksplantatów uwodnioną lanoliną z *M* w stężeniu 2×10^{-4} i 5×10^{-4} , pipetowanie kropli oleju rycynowego na górną powierzchnię eksplantatu również z *M* w tym samym stężeniu, co powyższe, nie wykazało wyraźnych różnic w porównaniu z eksplantatami kontrolnymi traktowanymi tylko lanoliną czy olejem rycynowym. Zastosowanie *M* o stężeniu 5×10^{-4} w kombinacji z kwasem α -naftalenooctowym w lanolinie nie zwiększało efektu heteroauksyny.

b) Sucha i świeża masa eksplantatów

Próby zastosowania kofeiny, tworzącej zespolone związki z substancjami rakotwórczymi łatwo rozpuszczalne w wodzie, jako związku ułatwiającego rozpuszczanie substancji rakotwórczych (H. Weil-Malherbe 1946) nie znalazły tu zastosowania z powodu jej toksycznego działania przy użyciu stężeń koniecznych do ich rozpuszczenia.

Tabela 1 — Table 1

Świeża i sucha masa tkanek marchwi w mg na pożywce z różnymi koncentracjami kofeiny

Fresh and dry weight of carrot tissue growing on media containing different concentrations of caffeine

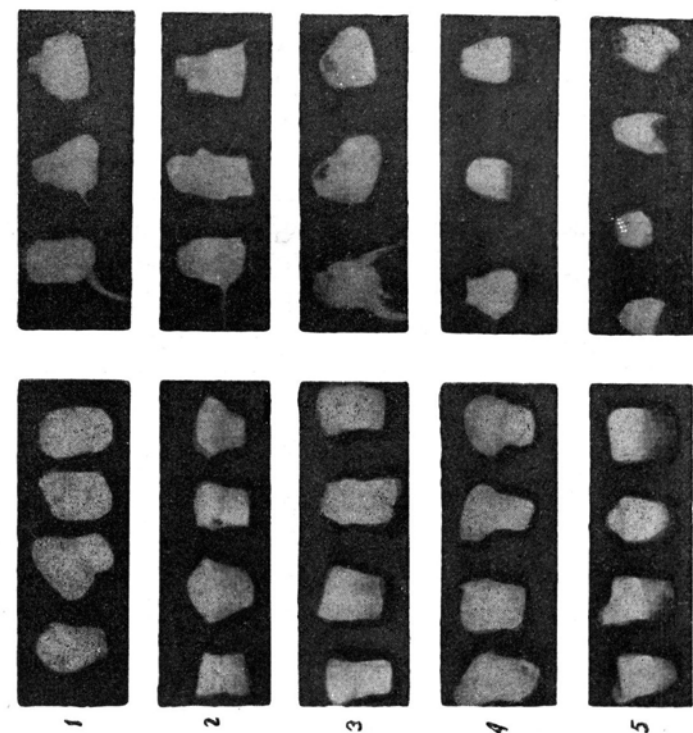
Różne koncentracje kofeiny — Different concentrations of caffeine							
	0.0	0.5%	1%	2%	4%	6%	8%
świeża masa fresh weight	1,45 ± 0,17	0,31 ± 0,06	0,16 ± 0,04	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,11 ± 0,01
sucha masa dry weight	0,069 ± 0,007	0,019 ± 0,003	0,010 ± 0,002	0,009 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,008 ± 0,000	0,007 ± 0,000

Z tego względu zastosowano substancje rakotwórcze w stanie krystalicznym, jak najbardziej rozdrobnione, przez dokładne roztarcie ich w moździerzu agatowym.

Eksplantaty cykorii, marchwi i topinambura wycinane korkoborem o ϕ 0,5 cm i dł. 1 cm hodowano w różnych okresach (7.XII—12.VIII.) na pożywkach zawierających na swej powierzchni 3 mm warstwę z *A* w stężeniu 4×10^{-5} , *B*, *D* i *M* w stężeniu 5×10^{-4} . Okazało się, że w niektórych przypadkach wzrost eksplantatów był nieznacznie stymulowany lub hamowany bądź też identyczny z kontrolą. Wydaje się, że powstałe od-

II

I

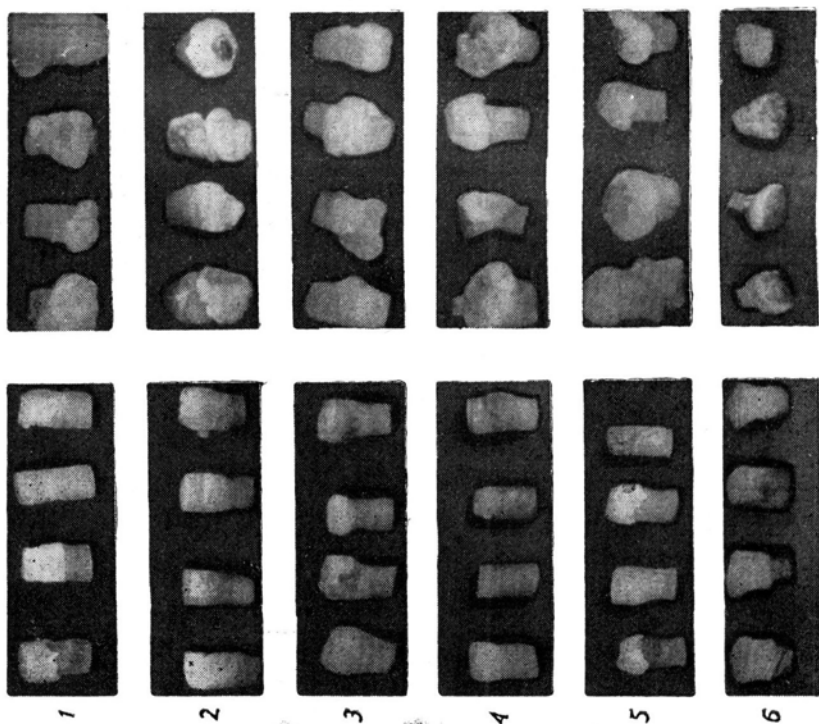


Ryc. 2. Eksplantaty marchwi (I) i topinambura (II) na pożywce: 1 — kontrolnej i z: 2 — A, 3 — B, 4 — D, 5 — M, w stanie krystalicznym w stężeniu 5×10^{-4}

Explants of carrot (I) and Jerusalem artichoke (II) growing on: 1 — control medium and on media containing crystalline; 2 — A, 3 — B, 4 — D, 5 — M, in concentration of 5×10^{-4}

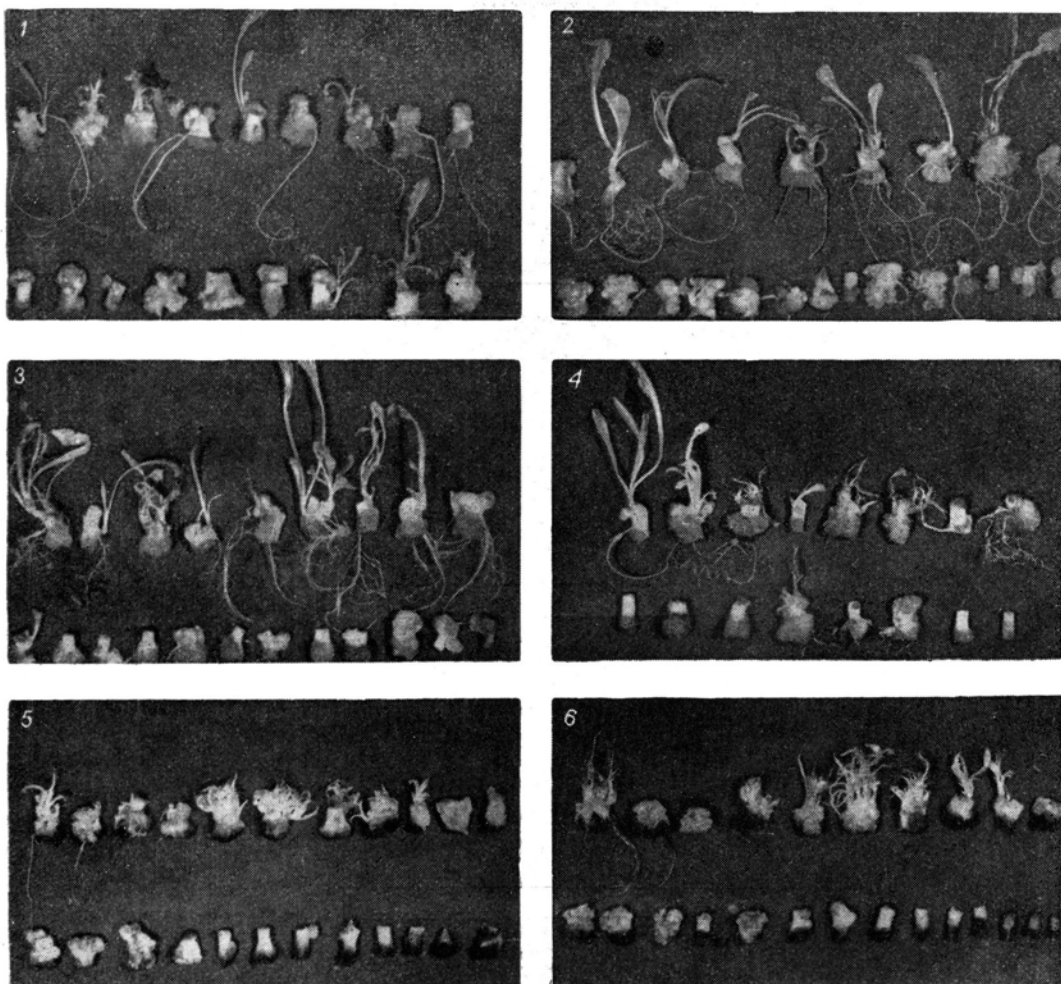
II

I



Ryc. 3 (Objaśnienia na str. 443)

Explanations in p. 443

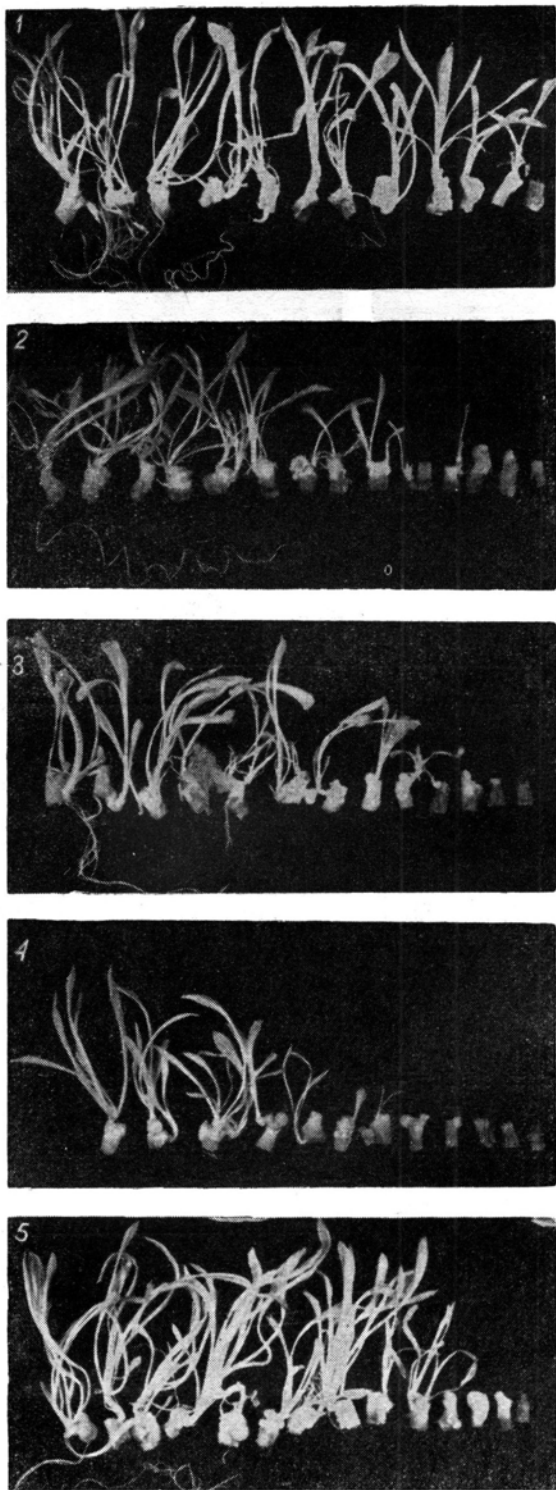


Ryc. 4. Wpływ A w stężeniu od 10^{-7} — 10^{-3} na eksplantaty cykorii: 1 — kontrola; 2 — 10^{-7} ; 3 — 10^{-6} ; 4 — 10^{-5} ; 5 — 10^{-4} ; 6 — 10^{-3}

The influence of A in concentrations of 10^{-7} — 10^{-3} on explants of succory: 1 — control; 2 — 10^{-7} ; 3 — 10^{-6} ; 4 — 10^{-5} ; 5 — 10^{-4} ; 6 — 10^{-3}

Ryc. 3. Wpływ A w stężeniu od 10^{-7} — 10^{-3} na eksplantaty marchwi (I) i topinambura II: 1 — kontrola; 2 — 10^{-7} ; 3 — 10^{-6} ; 4 — 10^{-5} ; 5 — 10^{-4} ; 6 — 10^{-3}

The influence of A in concentrations of 10^{-7} — 10^{-3} on explants of carrot (I) and Jerusalem artichoke (II): 1 — control; 2 — 10^{-7} ; 3 — 10^{-6} ; 4 — 10^{-5} ; 5 — 10^{-4} ; 6 — 10^{-3}



Ryc. 5. Eksplantaty cykorii na pożywce: 1 — kontrolnej i z: 2 — 5×10^{-4} M, 3 — 10^{-4} M, 4 — 2×10^{-4} M, 5 — 5×10^{-4} M, w stanie krystalicznym w stężeniu 5×10^{-4} M.
 Explants of succory growing on: 1 — control medium, and on media containing crystalline auxin of 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 2×10^{-4} M, 5×10^{-4} M in concentration of 5×10^{-4} M.

Tabela 2 — Table 2

Sucha i świeża masa w mg eksplantatów cykorii, marchwi i topinambura po różnych okresach czasu na pożywce z A, B, D i M w stanie krystalicznym w stężeniu 5×10^{-4} (0 = waga wyjściowa, — = kontrola)

Dry and fresh weight in mg of the explants of succory, carrot and Jerusalem artichoke after different periods of culture growing on media containing crystalline A, B, D and M in concentration of 5×10^{-4} (0 = initial weight, — = controls)

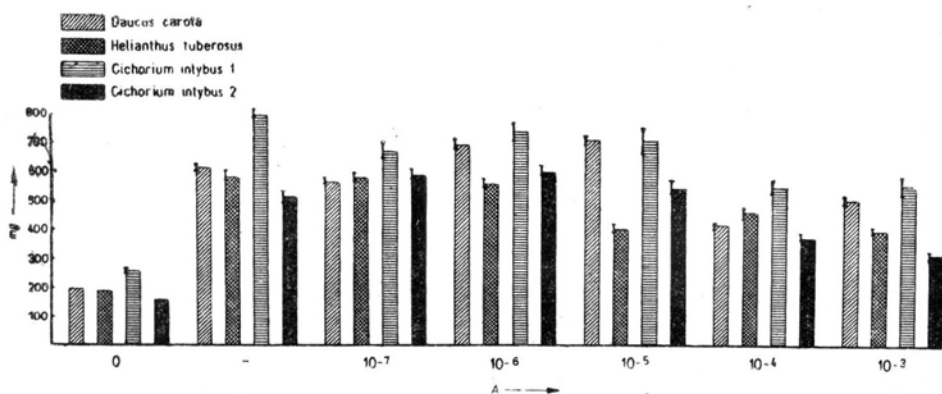
Świeża i sucha masa eksplantatów w mg po uwzględnieniu okresów hodowli
Fresh and dry weight of explants after different periods of culture)

	0	—	A	B	D	M
<i>Cichorium intybus</i> L. 18.XII.54— 15.II.55 świeża masa fresh weight	0,34	0,61	0,49	0,47	0,41	0,62
7.IV.55 — 2.VI.55	0,26 ± 0,01	0,57 ± 0,03	0,61 ± 0,03	0,52 ± 0,03	0,53 ± 0,03	0,50 ± 0,04
sucha masa dry weight	— —	0,062 ± 0,003	0,059 ± 0,002	0,051 ± 0,002	0,056 ± 0,002	0,054 ± 0,003
16.VI.55 — 12.VIII.55 świeża masa fresh weight	0,14 ± 0,03	0,51 ± 0,05	0,58 ± 0,05	— — —	— — —	0,61 ± 0,01
sucha masa dry weight	0,026 ± 0,001	0,070 ± 0,005	0,073 ± 0,004	— — —	— — —	0,074 ± 0,004
<i>Daucus carota</i> L. 18.XII.— 15.II.55 świeża masa fresh weight	0,19 — —	0,25 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,21 ± 0,01
5.IV. — 2.VI.55 świeża masa fresh weight	0,18 ± 0,00	0,28 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,28 ± 0,01
sucha masa dry weight	— — —	0,040 ± 0,001	0,038 ± 0,001	0,042 ± 0,001	0,038 ± 0,001	0,038 ± 0,001
<i>Helianthus tuberosus</i> L. 18.XII.54 — 15.II.55 świeża masa fresh weight	0,18 — —	0,29 ± 0,03	0,47 ± 0,07	0,35 ± 0,02	0,31 ± 0,03	0,30 ± 0,03
6.IV.55 — 2.VI.55 świeża masa fresh weight	0,20 ± 0,00	0,36 ± 0,04	0,36 ± 0,02	0,40 ± 0,02	0,36 ± 0,02	0,59 ± 0,07
sucha masa dry weight	— — —	0,071 ± 0,005	0,069 ± 0,003	0,075 ± 0,002	0,068 ± 0,003	0,096 ± 0,008

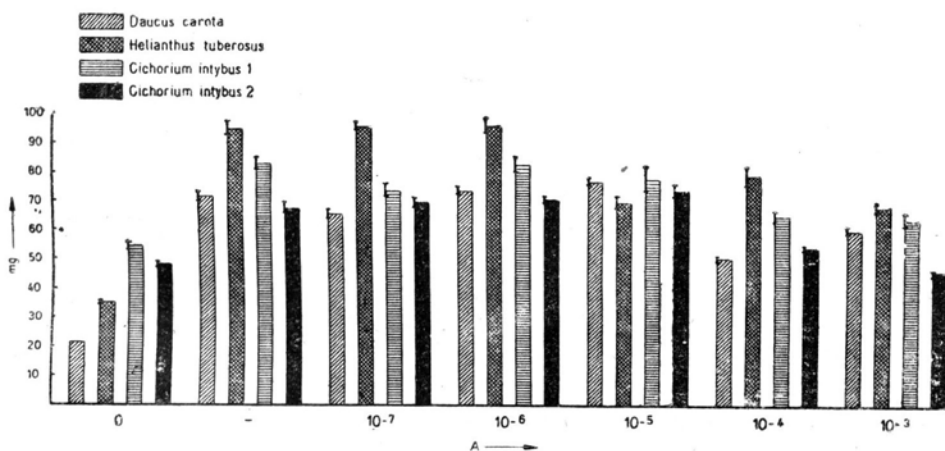
chylenia częściowo mogły być spowodowane niezbyt licznym materiałem (12—48 eksplantatów) i niemożliwością uzyskania zupełnie identycznych eksplantatów mimo jednorodnego materiału wyjściowego (tab. 2).

Zastosowanie *A* rozpuszczonego w bezwodnym acetonie w stężeniu od 10^{-7} — 10^{-3} również na eksplantatach cykorii, marchwi i topinambura w niższych stężeniach wykazało mniejsze lub większe odchylenia od eksplantatów kontrolnych, jednak począwszy od stężenia 10^{-4} we wszystkich przypadkach stwierdzono zahamowanie wzrostu (tab. 3).

a



b



Ryc. 6. Wpływ *A* w stężeniu od 10^{-7} — 10^{-3} na eksplantaty marchwi, cykorii i topinambura (o = waga wyjściowa) a) świeża masa; b) sucha masa
The influence of *A* in concentrations of 10^{-7} — 10^{-3} on explants of carrot, Jerusalem artichoke and succory (o = initial weight) a) fresh weight; b) dry weight

Tabela 3 — Table 3

Wpływ *A* w stężeniu od 10^{-7} — 10^{-3} na suchą i świeżą masę w mg eksplantatów marchwi, cykorii i topinambura (0 = waga wyjściowa, — = kontrola)

The influence of *A* in concentrations of 10^{-7} — 10^{-3} on dry and fresh weight of the explants of carrot, Jerusalem artichoke and succory (0 = initial weight, — = controls)

Świeża i sucha masa eksplantatów w mg po uwzględnieniu okresów hodowli

Fresh and dry weight of the explants after different periods of culture

	0	—	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
<i>Daucus carota</i> L. 6.XII.56—28.I.57 świeża masa fresh weight	0,20 ± 0,00	0,61 ± 0,02	0,56 ± 0,03	0,70 ± 0,03	0,70 ± 0,03	0,43 ± 0,01	0,50 ± 0,02
sucha masa dry weight	0,021 ± 0,000	0,072 ± 0,002	0,067 ± 0,003	0,074 ± 0,003	0,077 ± 0,003	0,050 ± 0,002	0,060 ± 0,003
<i>Helianthus tuberosus</i> L. 7.XII.56—28.I.57 świeża masa fresh weight	0,19 ± 0,00	0,57 ± 0,04	0,57 ± 0,03	0,55 ± 0,04	0,40 ± 0,03	0,45 ± 0,04	0,40 ± 0,02
sucha masa dry weight	0,035 ± 0,001	0,095 ± 0,005	0,096 ± 0,004	0,096 ± 0,006	0,070 ± 0,004	0,079 ± 0,007	0,068 ± 0,004
<i>Cichorium intybus</i> L. 6.XII.56—28.I.57 świeża masa fresh weight	0,26 ± 0,01	0,78 ± 0,05	0,67 ± 0,06	0,72 ± 0,06	0,70 ± 0,09	0,55 ± 0,05	0,55 ± 0,06
sucha masa dry weight	0,054 ± 0,002	0,083 ± 0,004	0,074 ± 0,006	0,082 ± 0,005	0,078 ± 0,008	0,065 ± 0,004	0,064 ± 0,005
<i>Cichorium intybus</i> L. 15.XII.56— 7.II.57 świeża masa fresh weight	0,16 ± 0,00	0,51 ± 0,03	0,59 ± 0,04	0,59 ± 0,03	0,54 ± 0,04	0,37 ± 0,02	0,31 ± 0,02
sucha masa dry weight	0,047 ± 0,002	0,068 ± 0,004	0,070 ± 0,003	0,071 ± 0,002	0,074 ± 0,004	0,054 ± 0,001	0,046 ± 0,002

c) Świeża i sucha masa transplantatów.

Wzrost tkanek marchwi hodowanych na pożywcze z *A* w stężeniu 4×10^{-5} i *B*, *D* oraz *M* w stężeniu 5×10^{-4} we wszystkich wypadkach zo-

stał zahamowany; nieznacznie przez *D* i *B* silniej przez *M*. Wybitnie natomiast przez *A*, mimo że jego stężenie było ponad $10 \times$ mniejsze.

Tabela 4 — Table 4

Wpływ *A* o stężeniu 4×10^{-5} i *B*, *D*, *M* o stężeniu 5×10^{-4} w stanie krystalicznym na suchą i świeżą masę tkanki marchwi hodowanej *in vitro* (średnie z dwóch powtórzeń, — = kontrola)

The influence of *A* in concentration of 4×10^{-5} and crystalline *D*, *B*, *M* in concentration 5×10^{-4} upon fresh and dry weight of the carrot tissue growing *in vitro* (average of 2 replicates, — = controls)

	—	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>D</i>	<i>M</i>
świeża masa fresh weight	1,45 ± 0,17	0,36 ± 0,04	1,23 ± 0,13	1,35 ± 0,11	1,04 ± 0,08
sucha masa dry weight	0,055 ± 0,003	0,019 ± 0,002	0,054 ± 0,004	0,054 ± 0,003	0,047 ± 0,002

Dla stwierdzenia, czy *A* najsilniej hamuje wzrost dlatego, że jest lepiej przyswajalny z powodu mniejszych cząsteczek, czy też posiada silniejsze właściwości toksyczne, zastosowano roztwory koloidowe przygotowane na podstawie metody Boylanda. Stężenie *A* wynosiło 2×10^{-5} , *B* $2,5 \times 10^{-4}$ i 5×10^{-4} *D* i *M* 5×10^{-4} . Okazało się, że wybitnie hamujące właściwości *A* zostały potwierdzone. Natomiast tkanki marchwi hodowane na pożywce z *B* i *D* w stężeniu $2,5 \times 10^{-4}$ wykazały również pewne zahamowanie, większe natomiast tkanki hodowane na pożywce z *M*.

Tabela 5 — Table 5

Świeża i sucha masa (w mg) tkanki marchwi hodowanej *in vitro* w okresie od 23.VII do 17.IX.1956 na pożywkach z *A*, *B*, *D*, *M* w stanie koloidowym (— = kontrola)

Fresh and dry weight in mg of carrot tissue growing *in vitro* on media containing colloidal solutions of *A*, *B*, *D*, *M* (— = controls)

	—	<i>A</i>	<i>B</i>		<i>D</i>	<i>M</i>
		2×10^{-5}	$2,5 \times 10^{-4}$	5×10^{-4}	$2,5 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-4}$
świeża masa fresh weight	1,46 ± 0,15	0,44 ± 0,08	1,33 ± 0,08	1,44 ± 0,17	1,29 ± 0,07	1,11 ± 0,08
sucha masa dry weight	0,055 ± 0,005	0,019 ± 0,003	0,053 ± 0,002	0,063 ± 0,005	0,058 ± 0,003	0,049 ± 0,003

Wybitnie hamujące działanie *A* proporcjonalne do jego stężenia zostało jeszcze raz potwierdzone przy użyciu całego zakresu stężeń od 10^{-7} — 10^{-3} . Natomiast *B*, *D* i *M* nie wykazał tak wyraźnego i proporcjonalnego zahamowania wzrostu, a jedynie nieznaczne odchylenia od kontroli.

Tabela 6 — Table 6

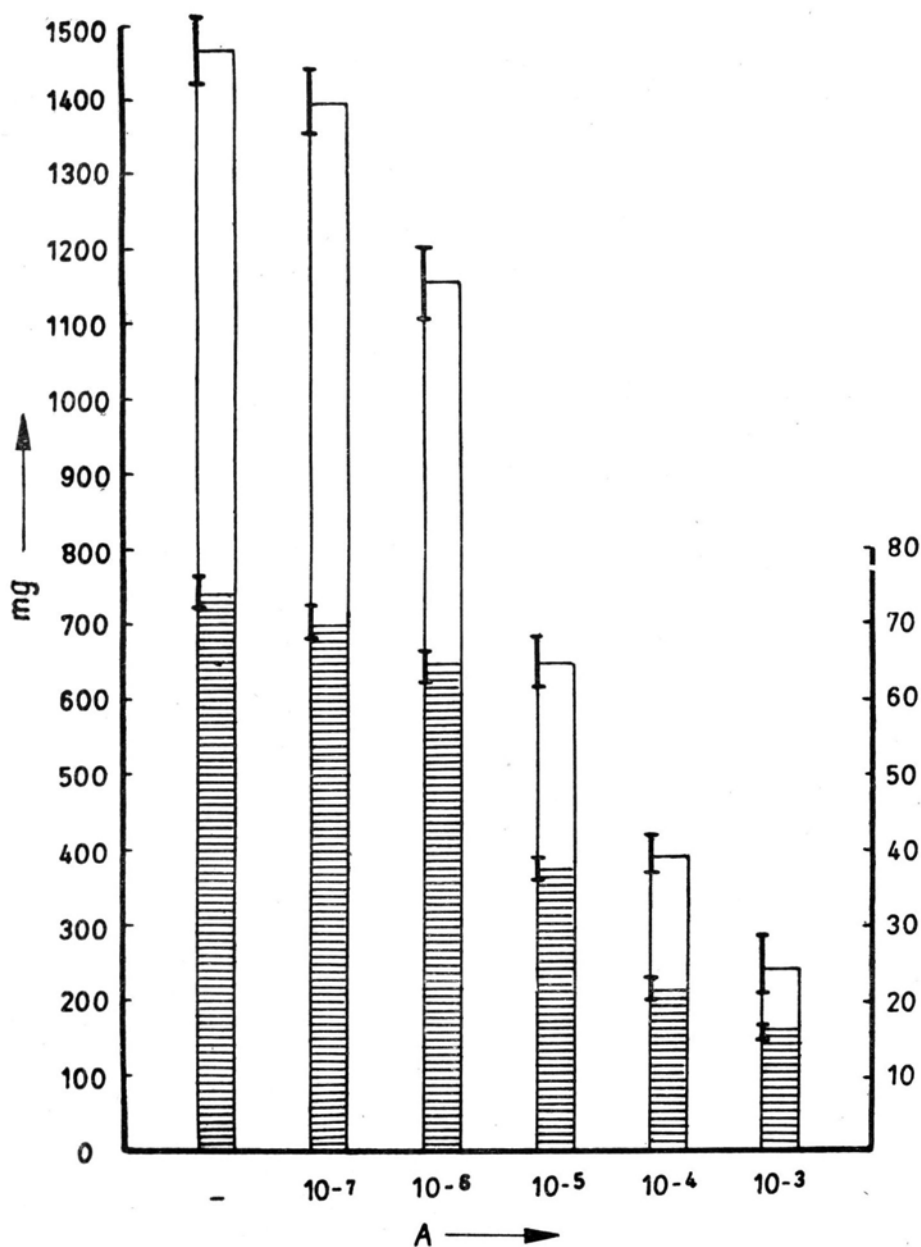
Świeża i sucha masa (w mg) tkanki marchwi hodowanej *in vitro* na pożywkach z różnymi koncentracjami *A*, *B*, *D* i *M* w stanie koloidowym (— = kontrola)

Fresh and dry weight in mg of carrot tissue growing *in vitro* on media containing different concentrations of *A*, *B*, *D* and *M* in colloidal solutions (— = controls)

	—		10^{-7}		10^{-6}		10^{-5}		10^{-4}		10^{-3}	
	świeża masa	sucha masa	świeża masa	sucha masa	świeża masa	sucha masa	świeża masa	sucha masa	świeża masa	sucha masa	świeża masa	sucha masa
	fresh weight	dry weight	fresh weight	dry weight	fresh weight	dry weight	fresh weight	dry weight	fresh weight	dry weight	fresh weight	dry weight
<i>A</i> ±	1,47 0,08	0,074 0,004	1,39 0,09	0,069 0,004	1,16 0,10	0,064 0,004	0,64 0,07	0,037 0,003	0,39 0,05	0,021 0,003	0,24 0,08	0,015 0,002
<i>B</i> ±			1,45 0,08	0,070 0,004	1,38 0,10	0,068 0,004	1,25 0,13	0,064 0,004	1,41 0,12	0,068 0,005	1,37 0,08	0,068 0,004
<i>D</i> ±			1,41 0,09	0,069 0,004	1,30 0,09	0,067 0,004	1,23 0,11	0,067 0,005	1,23 0,09	0,068 0,004	1,41 0,10	0,070 0,005
<i>M</i> ±			1,32 0,10	0,066 0,004	1,41 0,10	0,072 0,004	1,38 0,12	0,067 0,003	1,15 0,12	0,065 0,004	1,25 0,12	0,065 0,005

d) Intensywność oddychania

Tkanka marchwi jak i topinambura hodowana na pożywce z *D* o stężeniu 5×10^{-4} przez okres 1 roku w co 8-tygodniowych przeszczepieniach nie wykazała odchyień (w granicach błędu doświadczenia) w intensywności oddychania w porównaniu z tkankami kontrolnymi. Podobnie tkanki marchwi hodowane na pożywce z *A* w stężeniu 10^{-7} wykazały niemal identyczną intensywność oddychania z tkankami kontrolnymi. Natomiast hodowane na pożywce z większym stężeniem *A* (10^{-3}) zamierały i tylko część z nich około 10% rozwijała się wykazując obniżenie oddychania, co wydaje się być spowodowane częściowo tym, że część tkanki tkwiąca w pożywce zamierała i służyła jako filtr dla rosnących wyżej komórek, które oddychały prawdopodobnie normalnie, a stwierdzone obniżenie oddychania było spowodowane w pewnym stopniu obecnością tkanki mar-



Ryc. 7. Hamujący wpływ A w stężeniu od 10^{-7} — 10^{-3} na wzrost tkanki marchwi

The inhibiting effect of A in concentration 10^{-7} — 10^{-3} on the growth of carrot tissue

twej, która nie oddychała. Tkanki marchwi przeszczepione na pożywkę z B, D i M o stężeniu 10^{-7} — 10^{-3} wykazały również pewne różnice w intensywności oddychania. Jednak z powodu dość szczupłego materiału pomiary te przeprowadzono tylko dwukrotnie i z tego względu przyjmowane być muszą z bardzo dużą ostrożnością i wymagają powtórzeń.

Tabela 7 — Table 7

Intensywność oddychania tkanek marchwi i topinambura hodowanych na pożywce kontrolnej i z A, B, D, M

Respiratory intensity of carrot tissue and Jerusalem artichoke tissue growing on control (—) medium and media with A, B, D, M

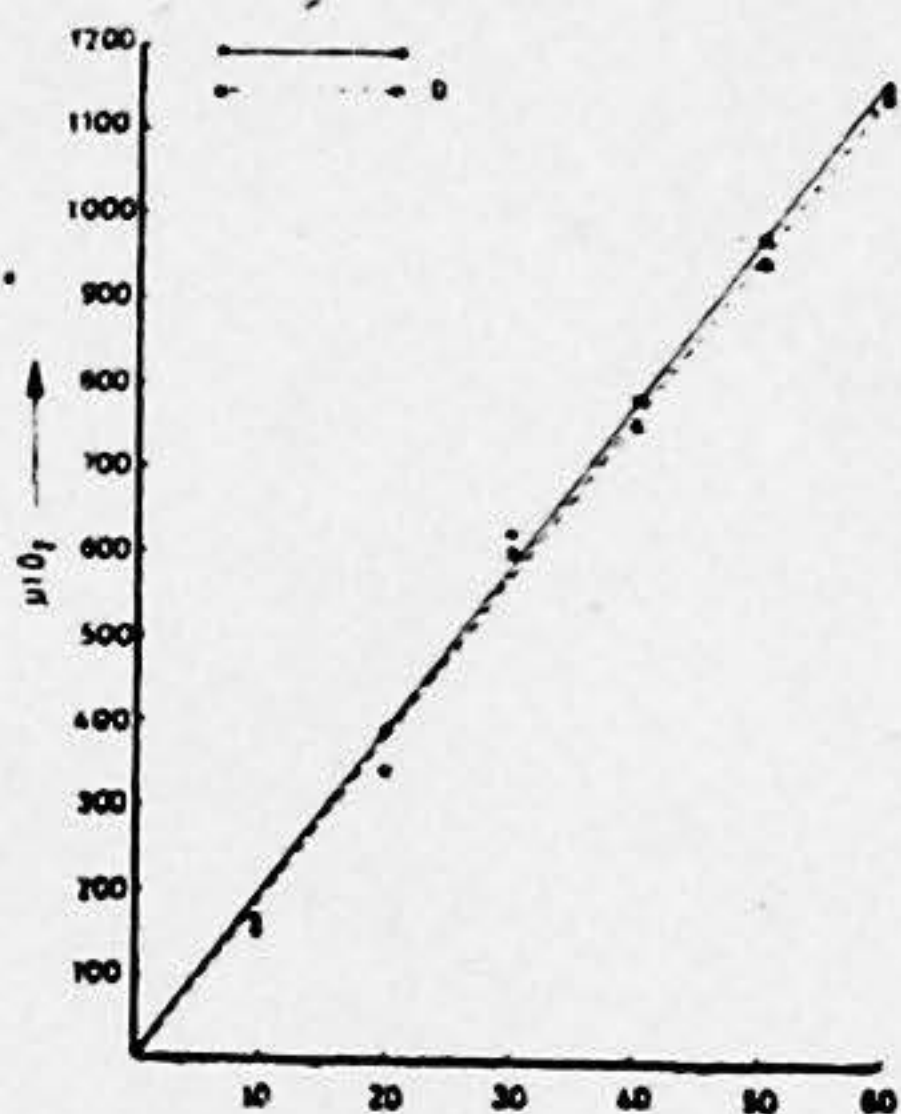
Tkanka — Tissue	Tlen pobrany na godzinę Oxygen absorbed per hour $\mu\text{l}/1\text{ g}$	
	świeżej masy of fresh mass	suchej masy of dry mass
<i>Daucus carota</i> L.	63,7	2270
<i>D. carota</i> L. + 5×10^{-4} D kryst.	63,4	2230
<i>Helianthus tuberosus</i> L.	119,5	1150
<i>H. tuberosus</i> L. + 5×10^{-7} D kryst.	113,5	1140
<i>Daucus carota</i> L.	60,0	2329
<i>D. carota</i> L. + A 10^{-7} koloid.	60,9	2350
<i>D. carota</i> L. + B „ „	57,5	2255
<i>D. carota</i> L. + D „ „	61,6	2198
<i>D. carota</i> L. + M „ „	58,1	2100
<i>D. carota</i> L. + A 10^{-3} „ „	46,4	1326
<i>D. carota</i> L. + B „ „	60,4	2409
<i>D. carota</i> L. + D „ „	57,9	1845
<i>D. carota</i> L. + M „ „	55,8	1800

e) Fosfatazy

Aktywność fosfataz w tkankach kontrolnych i hodowanych na pożywce z D w stężeniu 5×10^{-4} jest niemal identyczna (tab. 8).

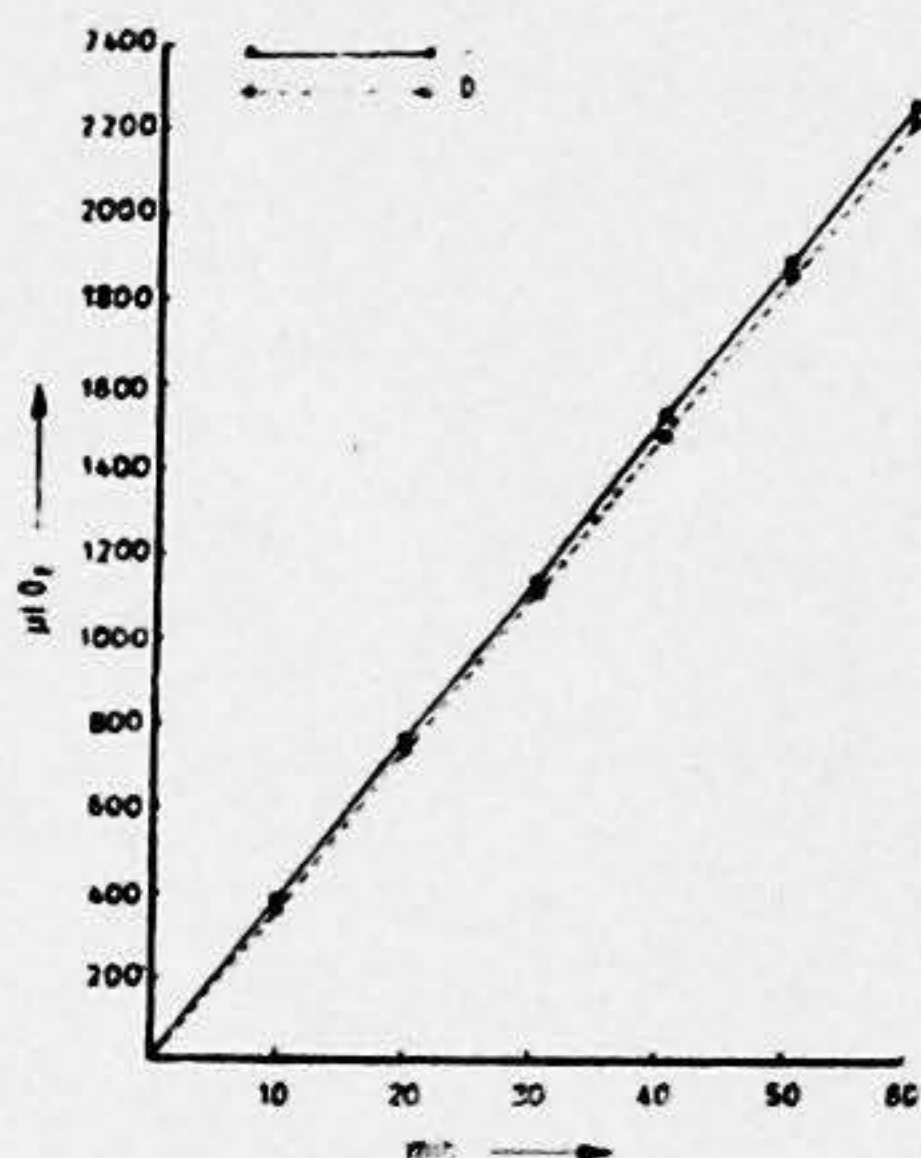
f) Aktywność katalaz

Tkanki hodowane na pożywkach z A, B, D, M w stanie krystalicznym o stężeniu 5×10^{-4} wykazały pewne odchylenia w aktywności katalaz w porównaniu z tkankami kontrolnymi. Jak wynika z wykresu, D bardzo silnie podwyższa jej aktywność, słabiej B i M, natomiast A hamuje.



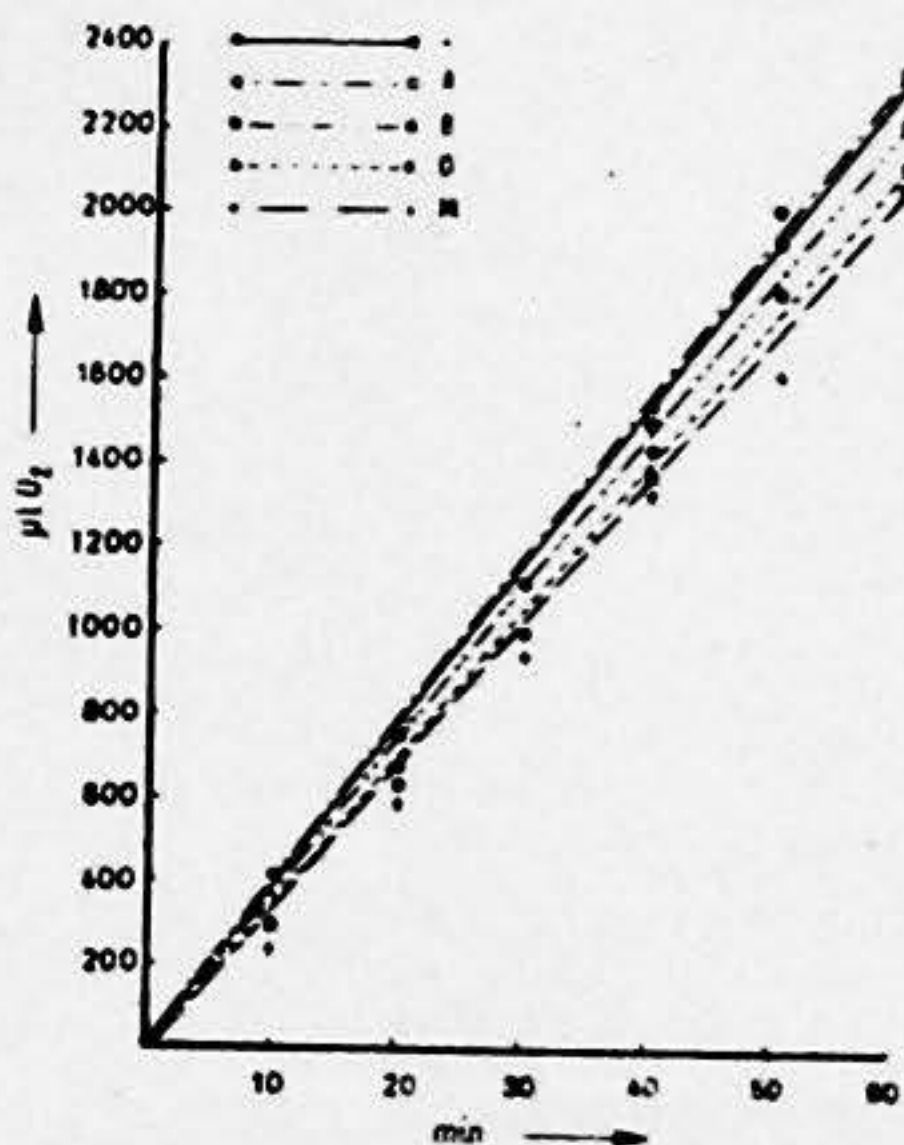
Ryc. 8. Intensywność oddychania tkanek topinambura hodowanych na pożywce zasadniczej (—) i na pożywce z D w stężeniu 5×10^{-4} w $\mu\text{l O}_2$ /na 1 g suchej masy (średnie z 12 powtórzeń)

Respiratory intensity of Jerusalem artichoke tissue growing on basal medium (—) and medium with crystalline D in concentration 5×10^{-4} , in $\mu\text{l O}_2$ /per 1 g of dry mass (average of 12 replicates)



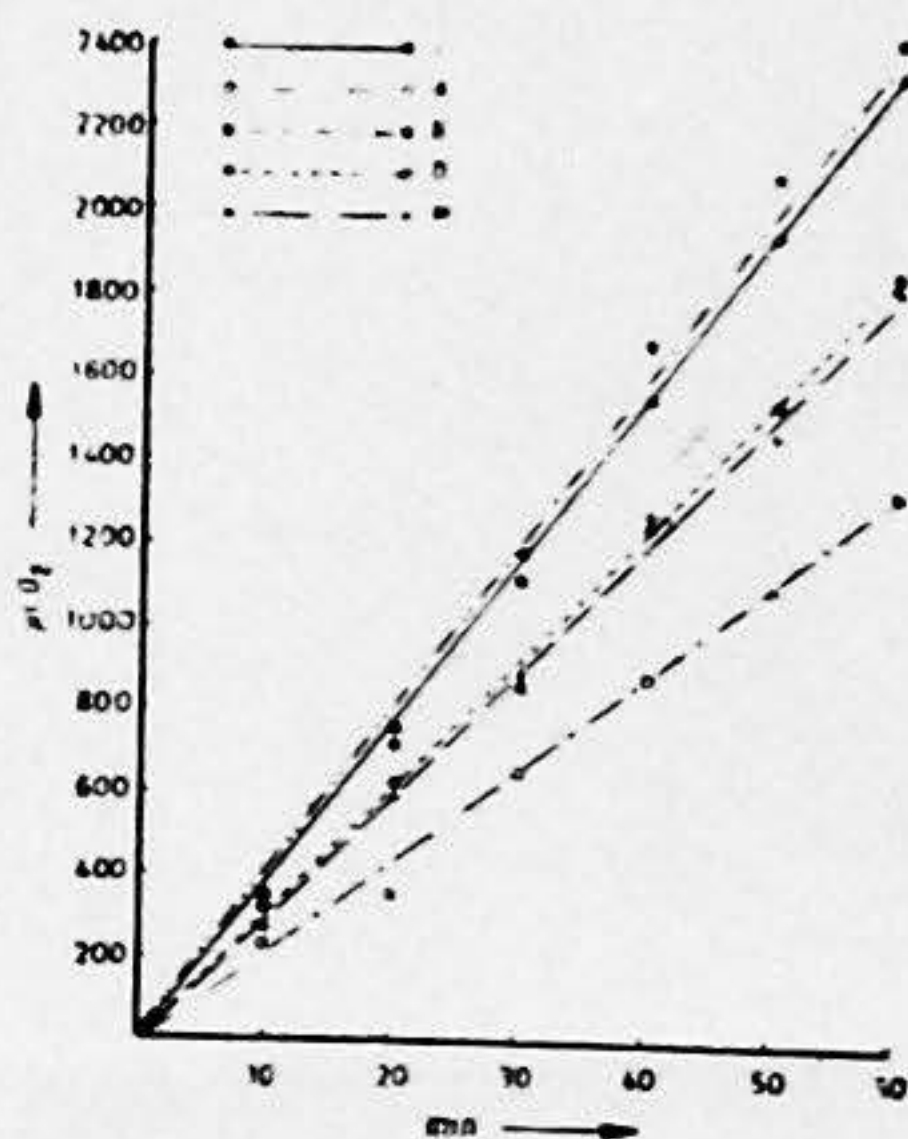
Ryc. 9. Intensywność oddychania tkanek marchwi hodowanych na pożywce zasadniczej (—) i na pożywce z D w stanie krystalicznym w stężeniu 5×10^{-4} , w $\mu\text{l O}_2$ /na 1 g suchej masy (średnie z 32 powtórzeń)

Respiratory intensity of carrot tissue growing on basal medium (—) and medium with crystalline D in concentration 5×10^{-4} in $\mu\text{l O}_2$ /per 1 g of dry mass (average of 32 replicates)



Ryc. 10. Intensywność oddychania tkanek marchwi hodowanych na pożywce zasadniczej (—) i na pożywce z A, B, D, M w stężeniu 10^{-7} w stanie koloidowym w $\mu\text{l O}_2$ /na 1 g suchej masy (średnie z 2 powtórzeń)

Respiratory intensity of carrot tissue growing on basal medium (—) and medium with A, B, D, M in colloidal state in concentration 10^{-7} in $\mu\text{l O}_2$ /per 1 g of dry mass (average of 2 replicates)



Ryc. 11. Intensywność oddychania tkanek marchwi hodowanych na pożywce zasadniczej (—) i na pożywce z A, B, D, M w stężeniu 10^{-3} w stanie koloidowym w $\mu\text{l O}_2$ /na 1 g suchej masy (średnie z 2 powtórzeń)

Respiratory intensity of carrot tissue growing on basal medium (—) and medium with A, B, D, M in colloidal state in concentration 10^{-3} in $\mu\text{l O}_2$ /per 1 g of dry mass (average of 2 replicates)

Tabela 8 — Table 8

Aktywność fosfataz w tkankach kontrolnych i hodowanych na pożywce z D o stężeniu 5×10^{-4}

Phosphatase activity in carrot tissue cultivated on basal medium and on medium with crystalline D in concentration 5×10^{-4}

Fosfataza (20 mg świeżej tkanki)

Phosphatase activity (20 mg of fresh tissue)

Tkanka marchwi Carrot tissue	μg fosforu nieorganicznego μg of inorganic phosphorus		
	t_0	t_{24}	hydroliza
—	5.1	82.4	77.3
+ 5×10^{-4} D kryst.	2.5	80.2	77.7

Te same kancerogeny zastosowane w stężeniu mniejszym ($2,5 \times 10^{-4}$) lecz w stanie koloidowym, obniżają aktywność katalaz z wyjątkiem A , który w tym przypadku nie wykazuje działania ani stymulującego, ani hamującego (tab. 9, ryc. 12 i 13).

Tabela 9 — Table 9

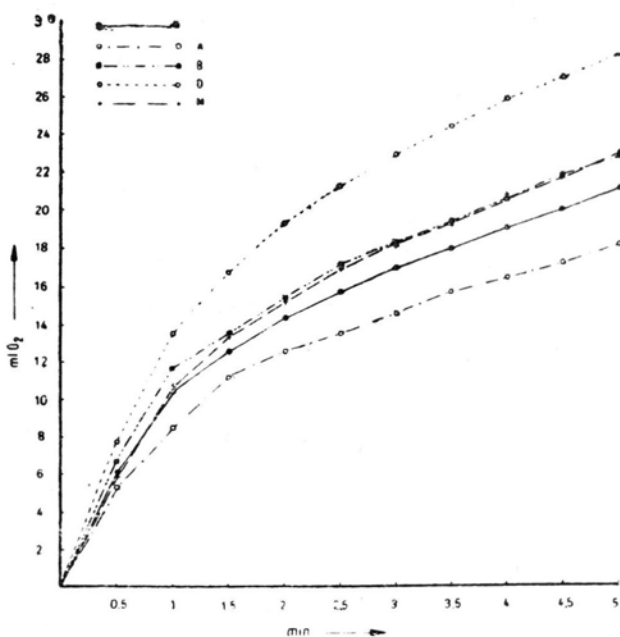
Aktywność katalaz w tkankach hodowanych na pożywce kontrolnej i z dodatkiem A , B , D , M

Catalase activity in carrot tissue growing on control culture medium and medium with colloidal A , B , D , M

Katalaza (2 g świeżej tkanki)

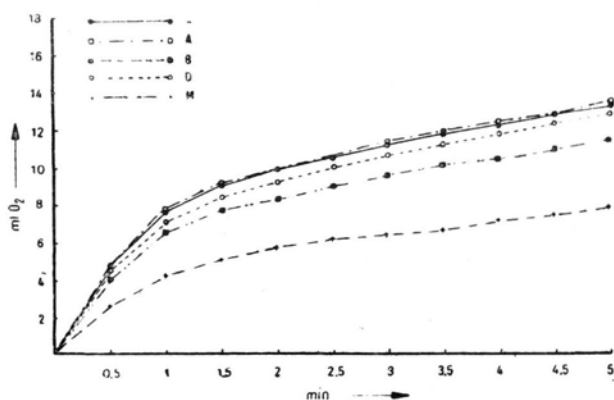
Catalase activity (2 g of fresh tissue)

Tkanka marchwi — Carrot tissue	m1 O_2 po 5 min. m1 O_2 after 5 min.
— 15.VI — 11.VIII.56	21,4
+ A 5×10^{-4} kryst.	18,5
+ B „	23,1
+ D „	28,6
+ M „	23,2
— 24.VII — 15.XI.56	13,2
+ A $2,5 \times 10^{-4}$ koloid.	13,4
+ B „	11,4
+ D „	12,7
+ M „	7,8



Ryc. 12. Aktywność katalaz w tkankach hodowanych na pożywce zasadniczej (—), i z dodatkiem A, B, D, M w stanie krystalicznym w stężeniu 5×10^{-4} (VI.1956).

Catalase activity in carrot tissue growing on basal medium (—) and with crystalline A, B, D, M in concentration 5×10^{-4} (VI.1956).



Ryc. 13. Aktywność katalaz w tkankach hodowanych na pożywce zasadniczej (—), i z dodatkiem A, B, D, M w stanie koloidowym w stężeniu $2,5 \times 10^{-4}$ (IX.1956)

Catalase activity in carrot tissue growing on basal medium (—) and with colloidal A, B, D, M in concentration $2,5 \times 10^{-4}$ (IX.1956)

Wydaje się, że stan skupienia cząstek mógł wywrzeć wpływ na reagowanie tkanek. Mimo że bezwzględne stężenie w pierwszym przypadku było większe, jednak działały one w mniejszych dawkach, natomiast przez zastosowanie w stanie koloidowym zwiększyła się względna ilość cząstek. Przedstawione różnice częściowo mogły wynikać z zastosowanej metody oznaczania intensywności katalazy, która nie jest zbyt dokładna.

DYSKUSJA

Dane doświadczalne otrzymane w tej pracy przemawiają przeciwko pogładowi, że chemiczne czynniki rakotwórcze są jakimiś swoistymi bodźcami wzrostowymi, natomiast przemawiają za tym, że są związkami uszkadzającymi komórkę, że są substancjami, które nawet w większych dawkach hamują wzrost i podział komórki. Jednak reakcja rośliny na działanie kancerogenów jest dość ograniczona i w porównaniu z innymi hyperplazjami roślin i zwierząt reprezentuje najmniejszy i najprostszy typ wyrosli, które nigdy nie osiągają stanu złośliwego. Reakcja ta wydaje się być raczej funkcją właściwości rośliny niż stosowanego czynnika. Szczególną toksyczność *D* na siewkach słoneczników stwierdzili G. Amoureux i A. Berthelot (1936). Również badania Levine'a wykazały zahamowanie wzrostu korzeni cebuli pod wpływem smoły węglowej, czerwieni purpurowej i *D*. Natomiast P. Stanley, M. D. Reimann i F. S. Hammet (1934) stwierdzili stymulację proliferacji u *Obelia geniculata* pod wpływem *D*, a S. E. Owen, H. Weiss i Prince stymulację korzeni grochu oraz rozmnażania i regeneracji organizmów z segmentów u *Euplania dorotocephala* pod wpływem *B*, *D*, *M*. Stymulację wzrostu korzeni pod wpływem *B*, *D*, *M* stwierdził również M. Levine (1951) we wtórnych korzeniach tworzonych przez izolowane fragmenty spichrzowego korzenia marchwi hodowane *in vitro*.

Badania anatomiczne eksplantatów marchwi i topinambura, traktowanych *D* i *M* w stanie krystalicznym lub rozpuszczone w oleju rycynowym czy lanolinie, aplikowane na górnych czy bocznych powierzchniach, nie wykazały w naszych badaniach specyficznych różnic w porównaniu z eksplantatami kontrolnymi.

R. Buvat (1942) stosując *B* i *M* w oleju rycynowym stwierdził na eksplantatach marchwi składających się z tkanki łykowej i kambialnej, hodowanych *in vitro*, obfitszy wzrost kalusa niż na eksplantatach kontrolnych. W naszych badaniach wyraźnych i powtarzalnych różnic nie stwierdzono. Jak wynika z badań M. Levine'a (1950), wpływ *B*, *D* i *M* (10^{-6} — $1,9 \times 10^{-4}$) na tkanki marchwi hodowane *in vitro* nie okazał się toksyczny, natomiast *D* i *M* (5×10^{-5}) działał stymulująco na wzrost roślin wyróżnicowanych z brodawkowatej lub szklistej masy tkankowej i na

wzrost korzeni. *D* wykazywał w tych hodowlach większe działanie niż inne używane kancerogeny. *D*, *B* i *M* zwiększał również wzrost korzeni wyróżnicowanych z tkanki tytoniu i słonecznika i podtrzymywał wzrost masy tkankowej. Badania histologiczne i cytologiczne tkanek marchwi hodowanych na pożywkach z kancerogenami wykazały odchylenia od tkanek normalnych i pewne podobieństwo do crown gall. Również w tkankach marchwi stwierdzono obecność komórek² olbrzymich, powstałych pod wpływem substancji rakotwórczych, nie-obszeregowanych w tkankach słonecznika i tytoniu.

W naszych badaniach w hodowli tkanek roślinnych *in vitro* stężenia węglowodorów aromatycznych, podobne do stosowanych przez M. Levine'a (10^{-6} — $1,9 \times 10^{-4}$), również nie wykazały działania toksycznego (roczne hodowle tkanek marchwi i topinambura na pożywce z *D* o stężeniu 5×10^{-4}). Zastosowanie większych stężeń *B*, *D* i *M* (10^{-7} — 10^{-3}) także nie wykazało wyraźnych efektów stymulujących czy hamujących wzrost. Działanie *A* należącego do barwników azowych różni się wybitnie od trzech powyższych węglowodorów aromatycznych. Jego właściwości są również inne. Rozpuszcza się w niedużych ilościach w wodzie i jest związkiem chemicznym bardzo aktywnym. Dyfunduje on dość szybko w pożywce agarowej, również osmoza jego do tkanek jest wyraźna. Uszkadzał on do tego stopnia komórki, że począwszy od stężenia 10^{-7} hamował wzrost i podział tkanek marchwi hodowanych *in vitro* proporcjonalnie do jego stężenia w pożywce.

Jak wynika z dostępnej literatury, M. Levine badał tylko działanie czerwieni purpurowej, w skład której wchodzi fragment orto-amidoazotoluenu, i to w małym stężeniu 10^{-6} i 5×10^{-6} , i nie stwierdził zwiększenia lub zmniejszenia działania czerwieni purpurowej na inne kancerogeny ani bezpośredniego wpływu na wzrost tkanek marchwi. Jak wynika z przedstawionych danych, wybitnie hamujące działanie *A* objawiało się zarówno w stosunku do tkanek hodowanych *in vitro*, jak i eksplantatów, chociaż tu dopiero przy stężeniu większym począwszy od 10^{-4} . Reagowanie tkanki na *A* i *B*, *D*, *M* jest zasadniczo różne, nie wiadomo tylko, czy z powodu mniejszych drobin *A* i jego dużej aktywności chemicznej, czy z powodu większej toksyczności. Tkanka marchwi hodowana na pożywce z *B*, *D* i *M* o zakresie stężeń od 10^{-7} — 10^{-3} nie wykazuje różnic morfologicznych w porównaniu z tkanką kontrolną. Również nie wykazuje różnic zewnętrznych tkanka marchwi i topinambura w rocznym okresie hodowli na pożywce z *D* o stężeniu 5×10^{-4} .

Przeprowadzone analizy biochemiczne, dla których konfrontacji brak danych w literaturze, wykazały również dużą odporność tkanek roślinnych w reagowaniu na kancerogeny.

Z powodu różnic w intensywności wzrostu można było sugerować

pewne zmiany również w mechanizmie oddychania. Z badań E. S. C o o k a, M. J. H a r t a i R. A. J o l y' e g o (1938) nad wpływem *D* na wzrost i oddychanie drożdży wynika, że stymulacja oddychania jest tylko do pewnego stopnia proporcjonalna do stymulacji wzrostu. Wraz ze zwiększonym stężeniem *D* wzrastała szybkość wzrostu, jednak intensywność oddychania zostaje wcześniej zahamowana. M. N. M e i s s e l (1944) stwierdził, że intensywność fermentacji w hodowlach drożdży z *M* wzrasta o 40%, podczas gdy zużycie tlenu zredukowane jest o 26%. Jak wynika z doświadczeń przeprowadzonych w niniejszej pracy, tkanki marchwi i topinambura w jednorocznym okresie hodowli na *D* o stężeniu 5×10^{-4} nie wykazały różnic w intensywności oddychania w porównaniu z tkankami kontrolnymi. Podobnie zachowywały się względem *A* o stężeniu 10^{-7} , mimo że przy tym stężeniu obserwowano już nieznaczne zahamowanie wzrostu. Stężenie *A* 10^{-3} będące toksyczne dla około 90% tkanek marchwi, które zamierały, hamuje również o 57% proces oddychania w tkankach, które przeżywały. Spowodowane jest to prawdopodobnie częściowo obecnością pewnej ilości tkanek martwych. Inne kancerogeny jak *B*, *D* i *M* o stężeniu 10^{-7} — 10^{-3} powodują także pewne odchylenia w oddychaniu tkanek marchwi, lecz dane te wymagają jeszcze potwierdzenia, gdyż przeprowadzone były na zbyt szczupłym materiale.

Aktywność fosfataz w tkankach marchwi hodowanych na pożywcze z *D* o stężeniu 5×10^{-4} w stanie krystalicznym jest identyczna jak w tkankach kontrolnych.

Natomiast aktywność katalazy różni się w tkankach kontrolnych i hodowanych na *A*, *B*, *D* i *M*, chociaż pewne zastrzeżenia można mieć do stosowanej metody. Wyjaśnienie tego trzeba pozostawić dalszym badaniom, gdyż trudno interpretować je na podstawie uzyskanych w pracy wyników.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki pozwalają więc jedynie na sformułowanie zupełnie ogólnych wniosków i wymagają dalszych dokładnych fizjologiczno-biochemicznych badań.

Przedstawione fakty przemawiają za tym, że chemiczne czynniki rakotwórcze uszkadzają komórkę roślinną podobnie jak i zwierzęcą, a w większych stężeniach hamują ich wzrost i podział.

„Modyfikowanie“ komórek prawidłowych pod wpływem kancerogenów, powodujące przekształcenie w swoisty sposób ich metabolizmu i przemianę w nowotworowe, tak wyraźne u zwierząt, u roślin wydaje się nie występować.

WYNIKI

1. Zastosowanie o-aminoazotoluenu (*A*) i 20-metylocholantrenu (*M*) na słonecznikach powodowało nieznaczne bujanie tkanek w miejscu zranienia i zadziałania pasty oraz zgrubienie łodyg u podstawy węzłów.

Wierzchołki łodyg po dekapitacji i smarowaniu pastami z *A* i *M* często ciemniały i usychały.

2. Badania anatomiczne eksplantatów marchwi i topinambura hodowanych na pożywce z 1 : 2 : 5 : 6-dwubenzooantracenenem (*D*) lub smarowanych pastami lanolinowymi czy olejem rycynowym z *M* nie wykazały wyraźniejszych różnic w porównaniu z eksplantatami kontrolnymi. Zastosowanie *M* w kombinacji z kwasem α -naftalenooctowym nie zwiększało działania heteroauksyny.

3. Przyrost świeżej i suchej masy eksplantatów cykorii, marchwi i topinambura na pożywkach z *A* o stężeniu od 4×10^{-5} i 3 : 4-benzopirenu (*B*), *D*, *M* 5×10^{-4} w stanie krystalicznym nie wykazuje wyraźnych i powtarzalnych różnic, a wynikiłe odchylenia częściowo tłumaczone mogą być użytym materiałem. Natomiast zastosowanie *A* wykazało wyraźne zahamowanie ich wzrostu. W tkankach marchwi i cykorii począwszy od stężenia 10^{-4} , a w tkankach topinambura od 10^{-5} , w stosunku do ich suchej masy.

4. Zastosowanie *A*, *B*, *D* i *M* w stężeniu od 10^{-7} — 10^{-3} wykazało wyraźne i proporcjonalne zahamowanie wzrostu tkanek marchwi pod wpływem *A* i to począwszy od najmniejszego stężenia. Inne kancerogeny *B*, *D*, *M* nie wywoływały większych i wyraźnych zmian w intensywności wzrostu tkanek marchwi.

5. Tkanąka marchwi i topinambura hodowana na pożywce z *A*, *B*, *D* i *M* w stężeniu 10^{-7} nie wykazuje wyraźnych różnic w intensywności oddychania. Stwierdzone obniżenie oddychania na pożywce z *A* 10^{-3} wydaje się być wynikiem pewnej ilości tkanek martwych.

6. Aktywność fosfataz w tkankach kontrolnych i hodowanych na pożywce z *D* w stężeniu 5×10^{-4} jest taka sama.

7. Stwierdzone różnice w aktywności katalaz wymagają dalszych badań przy użyciu dokładniejszej metody.

Organizm roślinny w inny sposób reaguje na substancje kancerogeniczne niż organizm zwierzęcy, co polega prawdopodobnie na mniej zwartej strukturze rośliny i słabszym powiązaniu fizjologicznym między organami i tkankami.

Pragnę wyrazić podziękowanie prof. drowi Jerzemu Czosnowskiemu, kierownikowi Katedry Fizjologii Roślin UAM w Poznaniu, za cenne rady i wskazówki udzielane mi w czasie wykonywania pracy, oraz doc. Alfonsowi Kuźdowiczowi z IHARu w Bydgoszczy, za dostarczenie materiału roślinnego potrzebnego do przeprowadzenia doświadczeń.

*Zakład Fizjologii Roślin UAM
w Poznaniu*

(Wpłynęło dn. 7.2.1958)

SUMMARY

Introduction

Since the discovery and preparation of carcinogenic substances it became possible for scientific workers to produce tumors in animals and to study the mechanism of their action. In comparison with the abundant literature pertaining to the action of these substances on laboratory animals there are very few papers dealing with their influence on plants.

Komuro-Hideo (1931—1932) was the pioneer of investigations on the influence of carcinogenic substances on plants. He described a variety of cytological and histological changes which he called „Phyto-teertumor” caused by suspensions of tar in the root tip of *Vicia faba* seedlings.

Ortiz Picón (1932) who investigated similar problems explained the cellular changes caused by exposure to tar by a difference in osmotic pressure which caused plasmolytic phenomena and not by specific influence of the tar on roots. A continuation of this line of investigation are the papers of M. Levine (1934—1951). This author stated morphological and cytological changes in roots and found that the toxicity of tar is due to an inhibition of cell divisions. The same results were obtained by Ortiz Picón and J. C. Mottram. The slightly stimulating action of 3:4-Benzpyrene (*B*), 1:2:5:6-Dibenzanthracene (*D*) and 20-Methylcholanthrene (*M*) on excised pea roots was stated by S. E. Owen, H. A. Weiss and L. H. Prince. The results of a later work of M. Levine (1951) on the influence of carcinogenic and growth substances on the tissue of carrot root grown in vitro are in accordance with the stimulating action of carcinogenic substances on roots. It appeared that *D*, *B* and *M* stimulate the growth of root but do not cause the growth of calluses which form easily on the nutrients containing the carcinogens used in the experiment.

The whole cycle of Levine's papers on the influence of carcinogenic and growth substances and of *Agrobacterium tumefaciens* made on a variety of plants showed that smearing with carcinogenic substances causes an overgrowth of tissue in the neighbourhood of the wound and of the smeared surface, and that it also causes a thickening of the stem.

The carcinogenic substances applied to plants cause an overgrowth of a limited number of cell generations and the rates of their divisions is balanced by the differentiation of the daughter cells, provided both processes go on rapidly. Berthelot and Amoureux (1937) in their investigations of the reaction of sunflower to different substances, among them to carcinogens, stated a great toxicity of *D*. The other carcinogen, namely *B* — as it results from the experiments of Rarei and Gumel (1939) — used in smaller concentrations stimulated the growth of the green parts of barley and wheat. The increasing rate of cellular divisions, the rapid growth and emergence of additional roots on tomato, tobacco and syringa plants as a result of the action of a fraction of tar and of pure *B* have been confirmed by Kissner and Havas (1940).

Goldstein (1937) in his investigations on unicellular organisms

used *Escherichia communior* and stated that *D* and *M* increase the rate of cell divisions by about 50%. Almost at the same time Dodge and Dodge (1937) investigated the influence of *M* on the morphology and growth of yeast and showed that morphological changes, stimulation of growth and fermentation were due to *M*. The work of Cook, Hart and Joly (1938) on the influence of *D* on the growth and respiration of yeast showed a close relation to the concentration used. Greater concentrations stimulated respiration while weaker ones though yet active in stimulating growth, decreased respiration respectively. Meissel (1944) in his paper on the action of *A*, *B* and *M* on yeast cultures showed an accumulation of the substances in the cell protoplasm, especially in lipids and hypertrophy of the mitochondria. It appeared that in cultures with *M* the level of fermentation increases by about 40% while the consumption of oxygen is reduced by 26%. Changes in the structure of chondriom and decreased oxygen absorption indicated rather a pathological reaction than a common fermentative transformation. Cellular changes due to *B* and especially to *A* are greater than those due to *M*. Skupieński (1934—1952) carried on the investigations on the carcinogenic action of tar on the fungus *Cladosporium herbarum* L.

R. Buvat (1942) was the first to apply carcinogenic hydrocarbons to the culture of plant tissues *in vitro*. It appeared that the explants of carrot exposed to carcinogens produced sharply outlined abundant outgrowths of callus while the control, treated with the solvent only, was covered with pseudothallium and a few small cambial outgrowths. Analogical investigations on a culture of carrot tissue were made by M. Levine (1950). *D* and *M* stimulated to a certain degree the growth of plantlets which differentiated out of a bulbulous and hialine mass of tissue. Strains growing on great concentrations of carcinogens, transferred on them again, were characterized by dissociation of their tissue. *D* showed a stronger action than other carcinogens used. All these changes are not malicious.

The aim of the present paper is to furnish a general physiological characteristic of tissues growing *in vitro* on various media with carcinogenic substances.

Material and methods

Studies on the action of carcinogenic substances were carried on sunflowers smeared with 1% *M* or *A* lanoline paste, the control plants with lanoline only. The technique of their application consisted in smearing the decapitated tip of the stem, the first and the second internode, the leaf petiole on a surface of 1×2 cm of which the outer tissues together with the phloem were previously removed.

Studies on the influence of carcinogenic substances were made on explants of carrot root and succory and on tuber roots of Jerusalem artichoke grown *in vitro*. For anatomical analyses regular pieces of tissue were cut having approximate dimensions of 0,5×0,5×1,5 cm. For determining the fresh and dry weight the method used was more precise: the explants were excised with a cork borer of 0,5 cm in diameter and then

they were cut into 1 cm long pieces. Experiments also were made on continuous cultures of tissues of carrot and Jerusalem artichoke. The carrot tissue was isolated in 1939 by Professor R. J. Gautheret while the tissue of Jerusalem artichoke was isolated by the author in 1953.

The first experiments were made on Knop's half concentrated mineral medium with an addition of glucose. It was replaced afterwards by Heller's medium with sucrose. Each experiment comprised 12—48 parallel cultures.

The concentrations of the cancerogenic substances A, B, D and M ranged from 10^{-7} to 10^{-3} . Because the carcinogenic substances are insoluble in water, in the first experiments they were dissolved in benzene which evaporated from the medium during sterilization and the carcinogens became crystallized. Their distribution in the medium was not uniform and for this reason the author used carcinogens finely ground in an agate mortar together with the medium, then she pipetted 1 ml of the medium containing one of the carcinogens on a solid basal medium. In later experiments carcinogenic substances were applied in a colloidal state according to the method of E. Boyland with the only difference that gelatine was replaced by agar-agar. As regards the transplanted tissue the author applied also carcinogens dissolved in castor oil pipetted dropwise on the upper surface of the explant, or in hydrated lanoline and smeared on the upper or side surface.

The fresh and dry weight of the explants or transplanted tissues was determined after 8 weeks.

For anatomical studies the explants of carrot and Jerusalem artichoke were fixed in Bouin's fluid mounted in paraffin and cut with a microtome into 15μ slices. The preparations were stained with methyl blue.

The determinations of respiration were made in the Warburg apparatus. The tissues were cut with a microtome into 0,5 mm thick slices then rinsed for 14 hours in tap water, afterwards twice in distilled water, dried, quickly weighed and transferred to the manometric vessels containing a phosphate buffer pH 5,59 with 2% glucose. The measurements were made at the same time for control tissues and for those from the carcinogenic medium. The results were calculated per 1 g of fresh and dry weight.

The activity of phosphatase of the carrot tissue grown on the control medium and on the medium containing D in a concentration of 5×10^{-4} was determined on the basis of the amount of inorganic phosphate released from potassium glycerol phosphate used as a substrate. The increase in inorganic phosphate was determined by the method of Fiske and Subbarow with the aid of the Lange photoelectric colorimeter.

The activity of catalase was determined on the basis of hydrogen peroxide decomposition while the produced oxygen was determined gasometrically.

Experimental results

The application of A and M to sunflower caused a slight overgrowth of the tissue at the place of the wound where the paste was applied and a thickening of the stem at the base of the nodes. The tips of the stems

after decapitation and smearing with paste containing *A* and *M*, respectively, often darkened and dried.

The anatomical studies of the carrot and Jerusalem artichoke explants grown on medium containing crystalline *D* in concentration 2×10^{-4} and 5×10^{-4} , the smearing of the lateral and upper surfaces of the explant with hydrated lanoline containing *M* in concentration 2×10^{-4} and 5×10^{-4} , the pipetting of a drop of castor oil with *M* in the same concentration on the explant's surface, did not differ essentially from the control explants treated only with lanoline or oil. The application of *M* in a concentration of 5×10^{-4} in combination with naphthalene acetic acid did not increase the action of the heteroauxin.

The increase in fresh and dry weight of the explants of succory, carrot and Jerusalem artichoke on mediums containing *A* in concentration 4×10^{-5} , *B*, *D* and *M* in concentration 5×10^{-4} in the crystalline state does not show any distinct or repeatable differences and the noticed deviations may be explained to a certain degree by the material used.

In concentrations from 10^{-7} to 10^{-3} and dissolved in anhydrous acetone *A* inhibits distinctly the growth of the explants of succory, carrot and Jerusalem artichoke: beginning in carrot explants from concentration 10^{-4} in relation to fresh and dry weight, in Jerusalem artichoke from concentration 10^{-6} in relation to fresh weight and from 10^{-5} in relation to dry weight. In the explants of succory a slight reduction of the increase of fresh and dry weight begins with concentration 10^{-7} .

The application of *A*, *B*, *D* and *M* in concentrations from 10^{-7} to 10^{-3} showed a distinct and proportional inhibition of the growth of carrot tissue due to the influence of *A* and beginning from the weakest concentration. The other carcinogens *B*, *D*, *M* produced no great and distinct changes in the intensity of growth of carrot tissue.

The tissue of carrot and Jerusalem artichoke grown on a medium containing *D* in crystalline state in concentration 5×10^{-4} during a period of one year and transplanted every 8 weeks did not show any difference in the intensity of respiration as compared with control tissue.

10^{-7} concentration of *A*, *B*, *D* and *M* in colloidal state causes no distinct changes in respiration of carrot tissue.

A in a concentration of 10^{-3} causes a 25% decrease of the intensity of respiration in respect to fresh weight and 57% in relation to dry weight. The same concentration of *B* produces no changes; *D* and *M* lower the level of respiration. These data need confirmation.

The activity of phosphatase in the control tissues and in those grown on medium containing *D* in a concentration of 5×10^{-4} , remains unchanged.

The differences noticed in catalase activity require further studies made by a more precise method.

The plant organism reacts in a different way to cancerogens than the animal organism. This fact probably depends on the looser structure of the plant and the weaker physiological correlation of organs and tissues.

LITERATURA

- Berthelot A., Amourex G., 1937, Sur la sensibilité des plantules aseptiques à quelques substances carcinogènes, *Compt. Rend.* 204: 517—519.
- Boyland E., Colloidal solutions of 1:5:6-Dibenzanthracene, *The Lancet* 19: 1108.
- Buvat R., 1942, Sur l'action d'hydrocarbures cancérigènes sur le tissu libérien de carotte cultive in vitro, *Compt. Rend.* 214: 128—130.
- Cook E. S., Hart M. J., Joly R. A., 1938, The effect of 1:2:5:6-Dibenzanthracene on the growth and respiration of yeast, *Science* 87: 331.
- Cook E. S., Hart M. J., Joly R. A., 1939, The effect of 1:2:5:6-Dibenzanthracene on the growth and respiration of yeast, *Amer. Jour. Cancer* 35: 543—545.
- Czosnowski J., 1952, Charakterystyka fizjologiczna trzech typów tkanek *Vitis vinifera*: normalnej, tumora bakteryjnego (crown-gall) i tumora chemicznego, hodowanych in vitro, *Poznań. Tow. Przyj. Nauk, Prace Kom. Biol.* 13: 189—208.
- Dodge C. W., Dodge B. S., 1937, Some effects of Methylcholanthrene on the morphology and growth of yeasts, *Ann. Mo. Bot. Gard.* 24: 583—590.
- Editorial Committee Harlan P. Kelsey, William A. Dayton, 1942 Standardized plant names.
- Euler H., Skarżyński B., 1942, *Biochemie der Tumoren* 1—260.
- Filutowicz A., Kuźdowicz A., 1951, *Mikrotechnika roślinna* 1—311.
- Gautheret R. J., 1942, *Manuel technique de culture des tissus végétaux*.
- Goldstein S., 1937, A microbiological test for carcinogenic hydrocarbons, *Science* 86: 176.
- Heller R., 1952, *Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro* 1—223.
- Jóźkiewicz S., 1953, Chemiczne czynniki rakotwórcze, *Postępy Biochemii* 1: 74—87.
- Kisser J., Havas, 1940, *Ber. dtsch. bot. Ges.* 57: 506 (cyt. za Struggerem).
- Komuro-Hideo, 1931, Betrachtungen über die zytologischen Veränderungen in den in Kohlenteerlösung getauchten Wurzelspitzen junger Pflanzen, *Proc. Imp. Acad.* 7: 110—116.
- Komuro-Hideo, 1932, Betrachtungen über die zytologischen Veränderungen in den in Kohlenteerlösung getauchten Wurzelspitzen junger Pflanzen, *Cellula* 41: 219—238.
- Levine M., 1934, A preliminary report on plants treated with the carcinogenic agents of animals, *Bull. Torrey Bot. Club* 61: 103—118.
- Levine M., 1936, The response of plants to localized applications of various chemical agents, *Bull. Torrey Botan. Club* 63: 177—199.
- Levine M., Bergmann H., 1936, The effects of cool tar and other chemicals on the roots of *Allium cepa*, *Am. Jour. Cancer* 26: 291—315.
- Levine M., 1939, Crown gall-like tumors induced with scharlach red on the plant *Kalanchoë*, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 40: 599—603.
- Levine M., 1940, Plant responses to carcinogenic agents and growth substances; their relation to crown-gall and cancer, *Bull. Torrey Botan. Club* 67: 199—226.
- Levine M., 1950, The growth of normal plant tissue in vitro as affected by chemical carcinogens and plant growth substances, I. The culture of the carrot tap-root meristem, *Am. Jour. Bot.* 37: 445—458.