Zawartość związków azotu w tkankach zdrowych i tumorach niektórych roślin

Nitrogen compounds in healthy and tumorous tissues of some plants

W. MACIEJEWSKA-POTAPCZYKOWA i A. NIEDZIELSKI

WSTĘP

Morfologia i anatomia tkanek roślinnych normalnych i patologicznych jest już w najogólniejszych zarysach poznana (prace Gauthereta, Morela i White'a), natomiast problem fizjologii i biochemii tumorów, a w szczególności linii zasadniczego procesu wykształcania się cech tumorowych, jest, jak dotychczas, znacznie mniej opracowany. Brak w tej dziedzinie przede wszystkim badań porównawczych, dotyczących metabolizmu tkanek tumorowych różnego pochodzenia. Jedną z nielicznych pozycji literatury na ten temat są obok prac Camusa i Gauthereta (1948a,b), Gauthereta (1942) i Czosnowskiego (1948) badania Czosnowskiego (1952), który opracował bardzo szczegółową charakterystykę chemiczną i enzymatyczną trzech typów tkanek *Vitis vinifera*: normalnej, tumora bakteryjnego i tumora chemicznego hodowanych in vitro.

Celem niniejszej pracy było przebadanie zawartości związków azotu w tumorach typu bakteryjnego i w naroślach wywołanych na roślinach przez owady, które to narośla uważane są przez szereg autorów za tumory pochodzenia wirusowego (Brakke, Maramorosh, Black 1950, 1953, Black 1944, 1947, 1949, 1952, Nickell i Brakke 1954, Lee 1955, Ryżkow 1960).

MATERIAŁ I METODY

Materiał badań stanowiły:

1. Łodygi i tumory *Datura stramonium*, wywołane przez *Agrobacterium tumefaciens*.

2. Ogonki liściowe topoli (*Populus nigra* L.) oraz występujące na nich tumory wywołane przez owada *Pamphigus bursarius* L. *Aphidae* (Mowszowicz — 1961). Do analiz używano: ogonków liści zdrowych, ogonków zakażonych tumorem, tzn. ich wycinków sąsiadujących z tumorami i tumorów.

3. Liście i galasówki dębu szypułkowego (*Quercus robur* L.) wywołane przez owada *Diplolepis (Dryophanta) quercus-folii* L. — *Hymenoptera* (Mowszowicz 1961).

Rosliny *Datura* zakażone *Agrobacterium tumefaciens* hodowano w szklarni w okresie letnim, liście topoli i dębu zebrano w drugiej połowie października.

Fracjonowanie związków azotu przeprowadzono metodą Thimmana (1957, 1960). Próbkę badanych tkanek o wadze około 40 mg suchej masy rozcierano w moździerzu porcelanowym z 6 ml zimnego 10% kwasu trójchlorooctowego (TCA). Po dokładnym odwirowaniu próbkę przy 4000 obr/min płyn nadosadowy dekantowano, a osad przemywano powtórnie 4 ml 10% TCA. W połączonych płynach oznaczano azot frakcji kwasorozpuszczalnej. Pozostały osad odlipidowywano mieszaniną

Tabela 1 — Table 1

Zawartość związków azotu poszczególnych frakcji w łodygach i tumorach *Datura stramonium* L.

Fractionation of nitrogen compounds of stems and crown gall tumours of *Datura stramonium* L.

Frakcje azotu Nitrogen fractions	Doświadczenie Experiment	N w łodygach % suchej masy N in stems % of dry matter	N w tumorach % suchej masy N in tumours % of dry matter
Kwasorozpuszczalna Acid-soluble	I	0,67	1,56
	II	0,70	1,55
	III	0,70	1,56
Kwasy nukleinowe Nucleic acids	I	0,13	0,33
	II	0,12	0,32
	III	0,12	0,33
Białka Proteins	I	0,63	2,42
	II	0,62	2,46
	III	0,61	2,43
Razem Total	I	1,43	4,31
	II	1,44	4,33
	III	1,43	4,31

etanolu-eteru (3 : 1) w temperaturze wrzenia mieszaniny trzema kolejnymi porcjami. Następnie osad ogrzewano z 6 ml 5% TCA przez 20 minut w temperaturze 80°C, odwirowywano i powtórnie przemywano 4 ml 5% TCA. Połączone płyny zawierały frakcję kwasów nukleinowych, w osadzie pozostawały białka. Analizę zawartości związków azotu poszczególnych frakcji przeprowadzano mikrometodą Kjeldahla opisaną przez Biełozierskiego (1952). Jednocześnie dla kontroli oznaczano w oddzielnych próbkach całkowitą zawartość azotu.

Każde doświadczenie powtarzano trzykrotnie. Oznaczenia wykonywano w 4—5 równoległych próbkach. Liczby podane w tabelach przedstawiają średnie wartości tych oznaczeń.

WYNIKI

Stwierdzono znaczną różnicę zawartości azotu całkowitego i N poszczególnych frakcji między łodygą i tumorem *Datura*.

Azotu całkowitego było w tumorach 3 razy więcej niż w łodygach.

Tabela 2 — Table 2

Zawartość związków azotu poszczególnych frakcji w ogonkach liściowych i tumorach

Populus nigra L.

Fractionation of nitrogen compounds of petioles and crown gall tumours of *Populus nigra* L.

Frakcje azotu Nitrogen fractions	Doświadczenie Experiment	N w ogonkach zdrowych % suchej masy	N w ogonkach z tumorami % suchej masy	N w tumorach % suchej masy
		N in healthy petioles % of dry matter	N in petioles with tumours % of dry matter	N in tumours % of dry matter
Kwasorozpuszczalna Acid-soluble	I	0,44	0,30	0,61
	II	0,46	0,29	0,63
	III	0,42	0,30	0,62
Kwasy nukleinowe Nucleic acid	I	0,13	0,10	0,18
	II	0,13	0,10	0,18
	III	0,13	0,10	0,18
Białka Proteins	I	0,62	0,41	0,80
	II	0,63	0,39	0,82
	III	0,64	0,40	0,81
Razem Total	I	1,19	0,81	1,59
	II	1,22	0,78	1,63
	III	1,19	0,80	1,61

Azot białkowy tumora stanowił przeszło połowę azotu całkowitego jego tkanek, a 4-krotną wartość frakcji białkowej łądygi. Podobnie i azotu kwasorozpuszczalnego i N kwasów nukleinowych było w tumorze 2 razy więcej niż w łądydze.

Nieco odmienny stosunek azotu frakcji białkowej i kwasorozpuszczalnej stwierdzono w łądygach. Frakcja kwasorozpuszczalna w stosunku do białkowej zawierała tu nieznacznie wyższy procent azotu.

Najwyższą zawartość azotu całkowitego stwierdzono w tumorach. W tkankach sąsiadujących z tumorami było około 2 razy mniej azotu w stosunku do tkanek tumora. Azot całkowity tkanek zdrowych przedstawiał wartość pośrednią.

Podobne różnice zachodziły w poszczególnych frakcjach azotu wyżej wymienionych tkanek.

Frakcja białkowa tumora, tkanek sąsiadujących z tumorem i tkanek zdrowych zawierała około połowy azotu całkowitego. Azot białkowy, azot kwasów nukleinowych i azot kwasorozpuszczalny tumorów stanowił dwukrotną wartość podobnych frakcji tkanek sąsiadujących z tumorem. Zawartość azotu poszczególnych frakcji w ogonkach liści zdrowych

Tabela 3 — Table 3

Zawartość związków azotu poszczególnych frakcji w liściach i galasówkach
Quercus robur L.

Fractionation of nitrogen compounds of leaves and crown gall tumours of
Quercus robur L.

Frakcje azotu Nitrogen fractions	Doświadczenie Experiment	N w liściach % suchej masy N in leaves % of dry matter	N w galasówkach % suchej masy N in crown gall tumours % of dry matter
Kwasorozpuszczalna Acid-soluble	I	0,64	0,25
	II	0,64	0,26
	III	0,64	0,26
Kwasy nukleinowe Nucleic acids	I	0,14	0,05
	II	0,13	0,06
	III	0,14	0,065
Białka Proteins	I	0,70	0,23
	II	0,72	0,25
	III	0,72	0,25
Razem Total	I	1,48	0,51
	II	1,49	0,56
	III	1,50	0,575

była wyższa niż w tkankach sąsiadujących z tumorem o około 1/3, a niższa od wartości frakcji azotu tumoru.

Jak wynika z tabeli 3, zawartość związków azotu była w galasówkach 3-krotnie niższa niż w liściach. W galasówkach było 3 razy mniej azotu białkowego i azotu kwasów nukleinowych, a około 2 razy mniej azotu kwasorozpuszczalnego niż w liściach. Najwyższy procent azotu całkowitego liści stanowiła frakcja białkowa, najniższy frakcja kwasów nukleinowych. W galasówkach wartości azotu białkowego i N frakcji kwasorozpuszczalnej były bardzo zbliżone.

DYSKUSJA

W badaniach niniejszych stwierdzono znaczny wzrost zawartości związków azotu w tkankach tumorów *Datura* i *Populus*. Szczególnie wyraźna różnica w zawartości N całkowitego i N poszczególnych frakcji u *Datura* oraz nieco mniejsza u *Populus* wskazuje na wzmożony metabolizm związków azotu tkanek tumorowych.

Stwierdzony w przypadku topoli znaczny wzrost zawartości związków azotu tumoru w stosunku do tkanki sąsiadującej, jak też wyraźna różnica w zawartości azotu tej ostatniej na korzyść tkanki zdrowej, nasuwa przypuszczenie, że w procesie rozwoju narośli następuje odciąganie związków azotu z tkanek otaczających tumor przez nieograniczenie rozwijające się tkanki narośli. Maciejewska-Potapczykowa (1960) stwierdziła podobne zjawisko u tumorów *Datura* w odniesieniu do zawartości związków fosforu. Znaczny wzrost zawartości związków azotu w tumorach *Datura* i *Populus*, a w szczególności N kwasów nukleinowych, pokrywa się z danymi Maciejewskiej-Potapczykowej (1960), która stwierdziła podobny wzrost zawartości związków fosforu frakcji KRN i KDN w tumorach *Datura stramonium*.

Zupełnie odmiennie kształtują się stosunki zawartości związków azotu w liściach i galasówkach dębu. Znaczny spadek zawartości związków azotu w galasówkach w stosunku do liści można tłumaczyć budową morfologiczną ich tkanek. Tkanki galasówek zbudowane są z olbrzymich komórek silnie uwodnionych o bardzo dużych wodniczках, w związku z czym zawierają one mniej cytoplazmy i substancji jądrowych, a dużo elementów niebiałkowych.

Jeśli chodzi o etiologię galasówek na liściach dębu, to nie jest ona jeszcze całkowicie wyjaśniona. Ber (1950) wyraża przypuszczenie, że mogą one powstawać w wyniku między innymi i tego, że owady wprowadzają do liści związki typu auksyn.

Wzrost zawartości związków azotu w tkankach tumorowych stwierdziło wielu autorów (Czosnowski 1952, Klein 1952, Lee 1952, Robson, Budd i Yost 1959, Rush, Swift i Klein 1959).

Rush i współpracownicy (1959) stwierdzili 3,5-krotny wzrost zawartości azotu całkowitego, 4-krotny wzrost frakcji KRN oraz znacznie podwyższoną zawartość nukleoproteidów w tkankach tumora fasoli. Robson, Budd i Yost (1959) wykazali dwukrotny przyrost zawartości azotu całkowitego, białkowego i DNA, przypadających na komórkę tumora *Parthenocissus tricuspidata* w stosunku do komórek tkanek normalnych, hodowanych w podobnych warunkach.

Przedstawione w niniejszej pracy dane dotyczące tumora bakteryjnego bielunia i tumora topoli, pochodzenia prawdopodobnie wirusowego, wydają się wskazywać na zasadnicze podobieństwa biochemiczne, zachodzące między nimi. Fakt jednak, że galasówki dębu tak znacznie różnią się pod względem zawartości związków azotu od tumorów bielunia i topoli świadczy o konieczności przebadania większej ilości roślin zakażonych tumorami różnego pochodzenia.

STRESZCZENIE

Poddano badaniom zawartość związków azotu w tkankach zdrowych i tumorach *Datura Stramonium* L., *Populus nigra* L., i *Quercus robur* L.

W tumorach *Datura* i *Populus* stwierdzono znacznie wyższą zawartość związków azotu poszczególnych frakcji (kwasorozpuszczalnej, kwasów nukleinowych i białek) niż w tkankach zdrowych. W galasówkach dębu zawartość związków N była znacznie niższa.

Zakład Biochemii
Uniwersytet Łódzki

(Wpłynęło: 27.7.1961 r.)

SUMMARY

The nitrogen compounds in healthy and tumorous tissues of *Datura Stramonium* L., *Populus nigra* L. and *Quercus robur* L. were compared.

The various N fractions (acid — soluble, nucleic acids and proteins) in tumorous tissues were considerably higher than in healthy ones. In the crown gall tumours of *Quercus* the levels of N compounds were significantly lower than in the leaves.

LITERATURA

- Ber A., 1950, Hormony wzrostu roślin zielonych, grzybów i bakterii, Warszawa.
Biełozierski A., Proskuriakow N., 1954, Ćwiczenia z biochemii roślin, 42—48, Warszawa.
Black L. M., 1944, Philos. Soc. 88: 132—144.
Black L. M., 1947, Sixth Growth Symp. 79—84.
Black L. M., 1949, Survey of Biol. Progress 1: 155—251.
Black L. M., 1952, Ann. N.Y. Sc., 54: 1067—1075.

- Brakke M. K., Maramorosh B., Black L. M., 1950, *Phytopath*, 40, 2.
Brakke M. K., Maramorosh Z., Black L. M., 1953, *Phytopath*. 43: 387—390.
- Camus G., Gautheret R. J., 1948 a) *C. R. Ac. Sc.* 226—744—755.
Camus G., Gautheret R. J., 1948 b) *C. R. Soc. Biol.* 142: 15—16.
- Czosnowski J., 1948, *Bull. Soc. Amis Sc. et Lettr. de Poznań IX*: 138—142.
Czosnowski J., 1952, *Bull. Soc. Amis Sc. et Lettr. de Poznań XIII*, Nr 4.
- Gautheret R. J., 1942, *Bull. Soc. Chim., Biol.* 24: 13—47.
- Klein R. M., 1952, *Plant Physiol.* 27: 335—354.
- Lee A. E., 1952, *Plant Physiol.* 27: 173—178.
- Lee A. E., 1955, *Amer. J. Bot.* 42: 693—698.
- Maciejewska-Potapczyk W., 1960, *J. Exp. Bot.*, 11: 98—103.
- Morel G., 1947, *C. R. Soc. Biol.* 141: 280—282.
- Mowszowicz J., 1961. Wyrośle pospolicie występujące w woj. łódzkim. *Łódzkie Towarzystwo Naukowe*, Nr 70, Wydz. III.
- Nickell L. G., Brakke M. K., 1954, *Amer. J. Bot.* 41, 390.
- Robson H. H., Budd M. A., Yost H. T. Jr., 1959, *Plant Physiol.* 34: 435—440.
- Rush E., Swift H., Klein R. M., 1959, *J. Biophys. and Bioch. Cytology* 6(1): 11—34.
- Ryżkow W. L., 1960, *Priroda* 7: 31—40.
- Thimann K. V., Ioes G. M., 1957, *Plant Physiol.* 32, 274: 396—402.
- Thimann K. V., Lolorava M. M., 1960, *Physiol. Plantarum* 13, 166.
- White P. R., 1939, *Amer. J. Bot.* 26: 59—64.