Aktywność pektyno-metylo-esterazy w łodygach i tumorach *Datura stramonium* L.

*Pectin-methyl-esterase activities in healthy and tumourous
stem tissues of Datura stramonium L.*

HENRYK ŁUKASIAK

Metabolizm cukrowców w tumorach roślinnych stanowi jeden z ważnych a jednocześnie mało jeszcze opracowanych problemów wzrostu patologicznego.

Badania anatomiczno-cytologiczne wykazały, że tkanka tumorowa jest bardzo słabo unaczyniona, lub nie posiada w ogóle elementów naczyniowych (G a u m a n 1960), co wiąże się prawdopodobnie z tym, że w tkankach tumorowych nie dochodzi do wytworzenia się dostatecznych ilości, celulozy i ligniny — podstawowych elementów ścian naczyń.

Z drugiej strony istnieją też różnice w przemianach biochemicznych w pewnych typach tkanek patologicznych tych samych roślin. Brucker (1959) w pracy nad metabolizmem cukrowców w tkankach patologicznych wykazał, że oddychanie w tumorach *Datura innoxia* było 30—50 % intensywniejsze niż w tkankach kalusowych, co wiązało się z nieco niższą zawartością kwasów cyklu Krebsa w tumorach.

Notuje się również pewne różnice w zawartości cukrowców prostych i złożonych w tumorach *Datura stramonium* (Ł u k a s i a k 1961).

Dążąc do wyjaśnienia metabolizmu ścian komórkowych w zdrowych tkankach roślinnych G l a s z i o u (1957, 1957b, 1958) zwraca uwagę na bardzo ważną rolę pektyno-metylo-esterazy (PME) w tym procesie.

Celem niniejszej pracy było przebadanie aktywności PME w tumorach *Datura stramonium* L.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badań stanowiły rośliny *Datura stramonium* L. oraz tumory wywołane na nich przez *Agrobacterium tumefaciens*.

Nasiona *Datura stramonium* wysiewano wiosną. Część roślin, które osiągały wysokość około 20 cm zakażano świeżą kulturą *Agrobacterium*, wprowadzając drobnoustroje do łodygi tuż pod najniższą leżącą parą liści (tumory widoczne na fotografii A ryc. 1). Po około dwu miesiącach wzrostu materiał brano do analiz. Drugą część roślin *Datura* zakażano w okresie kwitnienia wprowadzając drobnoustroje do wierzchołkowej

części rośliny (tumory na tych roślinach ilustruje fotografia B). Po upływie około miesiąca pobierano materiał do badań.

Aktywność PME określano na podstawie ilości dwutlenku węgla wydzielonego z roztworem węglanu sodu w wyniku reakcji z uwolnionymi grupami karboksylowymi substancji pektynowych (Glasziou 1958).

Ilość wydzielonego dwutlenku węgla mierzono metodą manometryczną posługując się aparatem Warburga.

Każda próbka zawierała 3 ml 0,5% roztworu substancji pektynowych, uzyskanych ze śliwek metodą Kertesza (1936), 0,5 ml homogenatu z tumorów, lub łądyg oraz 0,5 ml 1% roztworu węglanu sodu.

WYNIKI

Poniżej zamieszczone tabele i wykresy obrazują uzyskane wyniki. Większą aktywność PME notowano w tumorach, gdzie jest ona przeszło dwa i pół raza wyższa od aktywności tego enzymu w łądygach, które stanowiły kontrolę, a w tumorach młodych aktywność ta jest przeszło

Ryc. 1. Tumory na *Datura stramonium*

A — tumory 2-miesięczne; B — tumory 1-miesięczne
A — tumours 2-months old; B — tumours 1-month old

siedmiokrotnie wyższa od kontroli. W miarę starzenia się łądyg i rosnących na nich tumorów aktywność PME w łądygach utrzymywała się mniej więcej na jednakowym poziomie, podczas gdy aktywność PME w tumorach wyraźnie była niższa, co ilustrują wykresy (ryc. 1A, B; ryc. 2A, B).

Tabela 1 — Table 1

Aktywność PME w łodygach i tumorach *Datura stramonium* L. (tumory jedno-miesięczne)PME activity in *Datura stramonium* stems and tumours (tumours one month old)

Doświad- czenie Experi- ment	Czas inkubacji Time of incubation	Ilość wydzielonego CO ₂ w μ l CO ₂ evolved in μ l		Aktywność PME tumorów PME activity in tumours %
		łodygi stems	tumory tumours	
I	10	13	124	953,8
	15	21	210	1000,0
II	10	19	146	763,4
	15	28	239	853,5
III	10	18	134	744,4
	15	27	215	796,3
IV	5	14	56	400,0
	10	40	183	457,7

Celem łatwiejszego zorientowania się w wynikach, ilość wydzielonego dwutlenku węgla z próbek zawierających homogenat łodyg stanowiących kontrolę przyjmowano za 100 i w odniesieniu do tej wartości obliczano w procentach ilość wydzielonego dwutlenku węgla w próbkach z homogenatu tumorów.

Tabela 2 — Table 2

Aktywność PME w łodygach i tumorach *Datura stramonium* L. (tumory dwu-miesięczne)PME activity in *Datura stramonium* stems and tumours (tumours two months) old

Doświad- czenie Experi- ment	Czas inkubacji Time of incubation	Ilość wydzielonego CO ₂ w μ l CO ₂ evolved in μ l		Aktywność PME tumorów w % PME activity in tumours in %
		łodygi stems	tumory tumours	
I	10	18	47	261,1
	20	34	124	367,6
II	5	36	60	194,4
	10	53	126	237,7
III	5	32	55	171,9
	10	38	86	226,3
	15	51	130	255,0
	20	61	178	291,8

Przechowywanie homogenatu z danego egzemplarza do dwu godzin w lodówce nie wpływało na zmiany w aktywności PME.

W trakcie doświadczenia materiał inkubowano w temperaturze 23°C.

Każde doświadczenie powtarzano czterokrotnie z jednomiesięcznymi tumorami i trzykrotnie z tumorami dwumiesięcznymi.

Ryc. 2. Aktywność PME tumorów
A — 1-miesięcznych; B — 2-miesięcznych
PME activity of tumours:
A — 1-month old; B — 2-months old

Do doświadczenia brano jeden egzemplarz łądgi z tumorem i wykonywano trzy oznaczenia dla tumoru i trzy dla łądgi.

Na każde oznaczenie składały się trzy równoległe próbki. Liczby podane w tabelach przedstawiają średnie wartości tych oznaczeń.

DYSKUSJA

W niniejszych doświadczeniach obserwowano znacznie wyższą aktywność PME w tumorach niż w tkankach normalnych, co może wiązać się z wyższą zawartością zestryfikowanych grup karboksylowych, uwalniających się ze związków pektynowych, a także z większą zawartością tych substancji w tumorach.

Badania dotyczące metabolizmu ścian komórkowych prowadzone na głonach z rodzaju *Nitella* (Probine, Preston 1961) wykazały, że substancją wypełniającą przestrzeń między mikrofibrylami β-celulozy są związki pektynowe.

Ponieważ w tkance tumorowej nie obserwuje się typowego wzrostu wydłużeniowego, przeto wydaje się prawdopodobne, że ściany komórek tkanek tumorowych zawierają więcej substancji pektynowych, niż ściany komórek tkanki zdrowej, zbudowane głównie z celulozy.

Zaobserwowano również, że w miarę starzenia się tumorów nastę-

pował w nich znaczny spadek aktywności PME. Fakt ten pozostaje w sprzeczności z ogólnie przyjętym poglądem o nieograniczonych możliwościach wzrostu tkanki rakowatej. Należy jednak pamiętać, że w niniejszych doświadczeniach podłożem wzrostu tumorów były różne miejsca łodygi, co mogło mieć pewien wpływ na aktywność PME w tumorach. Zagadnienie to jednak mogłoby być rozstrzygnięte w doświadczeniach z materiałem hodowanym *in vitro*.

Nie jest również wykluczone, że na aktywność PME może wpływać obecność kwasu β -indolooctowego (IAA) występującego w tumorach w stężeniach wyższych, niż w tkankach normalnych (White, Braun 1942, Gautheret 1955). Jansen i Jang (1960) w swych badaniach nad metabolizmem substancji pektynowych wykazali, że inkubowanie materiału biologicznego z IAA przyspieszało metylowanie substancji pektynowych, co nasuwa przypuszczenie o wpływie IAA na aktywność PME.

Rozwiązanie zagadnienia, czy jednak wpływ IAA na zwiększoną metylację substancji pektynowych dotyczy właśnie PME wymagałoby dalszych badań na materiale hodowanym *in vitro*.

STRESZCZENIE

Posługując się manometryczną metodą Warburga porównano aktywność pektyno-metylo-esterazy (PME) w łodygach zdrowych i tumorach *Datura stramonium*.

Stwierdzono, że aktywność PME była znacznie wyższa w tumorach niż w łodygach. Aktywność PME w tumorach 2-miesięcznych była około 2,5 raza wyższa, a w tumorach 1-miesięcznych prawie 7-krotnie wyższa niż w łodygach zdrowych.

Katedra Biochemii
Uniwersytetu Łódzkiego

(Wpłynęło dn. 13.3.1962 r.)

SUMMARY

Using the Warburg manometric method pectin-methyl-esterase (PME) activities in healthy and tumorous stem tissues of *Datura stramonium* were compared.

The activities of PME were all considerably higher in the tumours, than in the stem tissues. The PME activity of two months old tumours was about 2,5 times higher and of one month old ones about 7 times higher than in healthy stems.

LITERATURA

- Brucker W., and Schmidt W. A. K., 1959, Deuth. Akad. Wiss., Berlin Ber. Deuth. Botan. Ges. 72.
- Gautheret R. J., 1955, Ann. Rew. Plant. Physiol. 6:433.
- Gauman E., 1960, Nauka o ifek. chorob. roślin, 638—641.
- Glasziou K. T., 1957, Austral. J. Biol. Sci. 3:337.
- Glasziou K. T., 1957b, Austral. J. Biol. Sci. 10:426.
- Glasziou K. T., 1958, Austral. J. Biol. Sci. 11:127.
- Jansen E. F., Jang R., Albershein P. and Bonner J., 1960, Plant. Physiol. 35:87.
- Kertesz Z. I., 1936, Ergebn. Enzymforsh. 5:233.
- Łukasiak H., 1961, Acta Soc. Bot. Pol. 30, (2):263.
- Probine M. C. and Preston R. D., 1961, Journal of Experimental Botany, 35:261.
- White P. R., Braun A. C., 1942, Conc. Res. 2:597.