Hamowanie wzrostu tumorów roślinnych chlorkiem chlorocholiny

Inhibition of crown-gall tumor growth in vivo by 2-chloroethyl trimethylammonium chloride (CCC)

A. RENNERT, L. KORBAS

WSTĘP

Grupa retardantów wzrostu obejmuje obecnie kilkadziesiąt syntetycznych związków chemicznych. Kilka z nich, szczególnie AMO-1618*, CCC, fosfon D, B995, zostało lepiej poznanych i znalazły one już praktyczne zastosowanie w rolnictwie jako czynniki zapobiegające wyleganiu pszenicy (Michniewicz, Chromiński, Belt 1967) oraz w ogrodnictwie przy hodowli roślin ozdobnych. Wykorzystanie retardantów w praktyce wydaje się szczególnie obiecujące, gdyż hamują one wzrost roślin bez efektów toksycznych, nawet przy stosunkowo dużych stężeniach.

Dotychczas stwierdzono, że rośliny traktowane retardantami wzrostu charakteryzują się mniejszą wrażliwością na mróz (Michniewicz, Kentzer 1965) oraz odpornością na susze i toksyczne działanie nadmiaru soli (Halevy 1967). Jak wynika z prac Martha i Mitchella (1960) niewielkie dawki AMO-1618 wprowadzone do gleby zapobiegały rozwojowi bakterii i grzybów oraz zwiększały odporność roślin na infekcję. CCC stosowany w hodowli kapusty hamował inwazję i rozwój mszycy kapuścianej (Emden 1964), zapobiegał również rozwojowi groźnej choroby więdnienia pomidorów wywołanej zakażeniem *Verticillium albo-atrum* (Sinha, Wood 1964). Tahori, Zeidler, Halevy (1965) wykazali, że retardanty: fosfon D, CCC, B995 są zdolne hamować infekcję *Sclerotium rolfsii* na siewkach fasoli oraz *Puccinia graminis* Pers. na źdźbłach pszenicy. Spryskiwanie krzewów czarnej porzeczki roztworem CCC zawierającym 0,5 % aktywnego składnika (Smith, Corke 1966) chroniło je w 73 % przed inwazją wielkopąkowca porzeczkowego: *Cecidiophopsis ribis* Nal. oraz zapobiegało w dużej mierze (66 %) infekcji *Botrytis cinerea*. Celem niniejszej pracy było sprawdzenie możliwości hamowania wzrostu i rozwoju roślinnych tumorów bakteryjnych przez zastosowanie chlorku chlorocholiny.

Stosowane skróty: AMO-1618, metylochlorek kwasu 2-izopropyl-4-dwumetyloamino-5-metylofenylo-1-piperidynokarboksylowego; CCC, chlorek 2-chloroetylotrójmetyloamoniowy; Fosfon D, chlorek 2,4-dwuchlorobenzylotrójbutylofosfoniowy; B995, kwas N-dwumetyloamino-aminoburszynowy

METODYKA

Eksperymenty wykonano w okresie czerwiec-wrzesień 1967 r. Do doświadczeń przeznaczono $20 \pm 1,8$ cm roślinki *Helianthus annuus* L. odmiany „Borowski prażkowany” rosnące w ogródku zakładowym. Serie doświadczalne obejmowały około 120 roślin, po 30 na każdą kombinację i były powtarzane trzykrotnie. Zdrowe roślinki zakażano wirulentnym szczepem *Agrobacterium tumefaciens* hodowanym przez 24 godz. na podłożu agarowo-ziemniaczanym (Rennert 1965). Do spryskiwania roślin stosowano roztwory CCC (krajowej produkcji) o stężeniu $5 \times 10^{-2} M$, $5 \times 10^{-3} M$, $5 \times 10^{-5} M$ w ilości 5 ml na jedną roślinkę. Przy badaniu miejscowego działania CCC na rozwój tumorów stosowano nasyczone roztworami tampony z waty, które zakładano na rośliny w miejscach zakażeń. Rośliny kontrolne posiadały tampony nasyczone wodą. Okres każdego eksperymentu trwał dwa miesiące. Po jego upływie rośliny wrywano i dokonywano pomiarów. W tabelach zawarto średnie wyniki z wszystkich serii doświadczeń, przy poszczególnych wynikach podano odchylenia standardowe.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Na podstawie podanych niżej wyników można stwierdzić, że CCC silnie hamuje tworzenie się tumorów u roślin słonecznika. Ilość zarażonych roślin z uformowanymi tumorami była o 50—70 % mniejsza po zadziałaniu CCC przy czym wielkości tych tumorów sięgały zaledwie 10—15 % wielkości tumorów kontrolnych. Efekt taki uzyskiwano zarówno po jednorazowym spryskaniu całej roślinki, jak i po

Tabela 1 — Table 1

Wzrost i tworzenie się tumorów bakteryjnych u roślin *H. annuus* spryskiwanych roztworem chlorku chlorocholiny ($5 \times 10^{-2} M$) przed inokulacją

Okres doświadczeń: 30.VI—11.IX.1967 r.

Crown-gall tumor growth and formation on *H. annuus* plants sprayed with CCC solution before inoculation

Time of experiments: 30.VI.—11.IX.

Traktowanie Treatment	Końcowa wysokość roślin w cm Final length of plants in cm	Średnia masa 1 tumoru w g Average mass of 1 tumor in g	% roślin bez tumorów Percent of plants without tumors
<i>A. tumef.</i>	$127,4 \pm 5,7$	$1,227 \pm 0,19$	0
<i>A. tumef.</i> +CCC	$87,0 \pm 4,7$	$0,103 \pm 0,027$	67,5
CCC	$86,0 \pm 5,3$	—	100,0
H ₂ O	$132,0 \pm 4,25$	—	100,0

lokalnym zadziałaniu na miejsce zakażone roztworem CCC (tampony). Jednakże rośliny spryskane chlorkiem chlorocholiny były o około 30 % niższe niż kontrolne (tab. 1), podczas gdy rośliny, na które CCC działało lokalnie tylko w miejscach infekcji, nie wykazywały istotnych odchyień wysokości od normy kontrolnej (tab. 2).

Można więc przyjąć, że wywołane działaniem CCC hamowanie rozwoju tumorów u roślin słonecznika nie jest następstwem ogólnego hamowania wzrostu tych roślin przez retardant.

Tabela 2 — Table 2

Wpływ CCC na wzrost i tworzenie się tumorów bakteryjnych u roślin *H. annuus* przy miejscowym stosowaniu roztworu ($5 \times 10^{-2} M$)

Okres doświadczeń: 15.VII.—29.IX.1967 r.

Influence of local treatment with CCC solution on growth and formation of crown-gall tumors on *H. annuus* plants

Time of experiments; 15.VII.—29.IX.

Traktowanie Treatment	Końcowa wysokość roślin w cm Final length of plants in cm	Średnia masa 1 tumoru w g Average mass of 1 tumor in g	% roślin bez tumorów Percent of plants without tumors
<i>A. tumef.</i>	110,1±2,6	1,850±0,46	0
<i>A. tumef.</i> + CCC	108,3±2,2	0,182±0,039	63,6
CCC	109,5±3,7	—	100,0
H ₂ O	113,0±2,8	—	100,0

Należy zaznaczyć, że poza wspomnianym skróceniem łodyg oraz niewielką brzezną chlorozą liści i większą nieco liczbą pąków kwiatowych występujących u roślin spryskiwanych roztworem CCC ($5 \times 10^{-2} M$) nie obserwowano żadnych innych ubocznych skutków jego działania.

Najsłabszy efekt antytumorowy otrzymano przez wprowadzenie CCC do gleby. Jednorazowe podlanie roślin doświadczalnych roztworem o stężeniu $5 \times 10^{-2} M$ (25 ml na jedną doniczkę o średnicy 16 cm) na kilka dni przed infekcją chroniło je przed formowaniem się narośli zaledwie w 30 %, a tumory wykształcone na pozostałych 70 % roślin były tylko o około 50 % mniejsze niż w kontroli.

Wydaje się, że mniejsza lub większa efektywność działania CCC na tumory, uzyskiwana przy różnych sposobach wprowadzania go do rośliny, zależy od ilości tego związku obecnego w zarażonej tkance. Jeżeli zaś na części roślin serii zadziałanej chlorkiem chlorocholiny powstawały niewielkie narośla (tab. 1 i 2) wynikało to z nierównomiernej penetracji CCC do tkanek poszczególnych osobników tych serii.

Przy badaniu działania CCC w trzech różnych stężeniach, stwierdzono, że wyniki uzyskane przy stężeniach $5 \times 10^{-2} M$ i $5 \times 10^{-3} M$ różniły się między sobą bardzo nieznacznie, natomiast przy stężeniu $5 \times 10^{-5} M$ retardant nie wykazał już żadnego działania antytumorowego u badanych roślin.

Tabela 3 — Table 3

Tworzenie się tumorów bakteryjnych u roślin, *H. annuus* w zależności od czasu działania roztworu CCC na rośliny

Okres doświadczeń: 11.VII—1.IX.1967 r.

Crown-gall tumors formation on *H. annuus* plants, depending on the time of treatment with CCC solutions

Time of experiments: 1.VII—11.IX.

Traktowanie Treatment	CCC $5 \times 10^{-2} M$		H ₂ O	
Czas oprysku Time of spraying	17 dni przed inokulacją 17 days before inoculation	24 godz. przed inokulacją 24 hours before inoculation	4—5 dni po inokulacji 4—5 days after inoculation	Inokulacja kontrolna Control inoculation
Ilość roślin zdrowych Number of healthy plants	21	11	19	0
Ilość roślin z małymi tumorami Number of plants with small tumors	12	8	8	3
Ilość roślin z dużymi tumorami Number of plants with great tumors	1	4	3	21

Z przeprowadzonych eksperymentów wynika, że CCC jest zdolny zapobiegać formowaniu się tumorów, jeśli wnikał do rośliny na jakiś czas przed wtargnięciem do niej patogena, a także w kilka dni po jej infekcji (tab. 3), a więc nawet wówczas gdy dokonał się już proces przekształcenia tkanek normalnych w tumorowe (Klein 1957). Można zatem przypuszczać, że antytumorowa aktywność CCC wiąże się z jego oddziaływaniem na metabolizm substancji wzrostowych rośliny. Odgrywają one dominującą rolę we zwroście patologicznym i są wytwarzane w tumorach w dużych ilościach (Klein, Vogel 1956; Bayer, Ahuja 1967). W zgodzie z tym pozostają wyniki naszych wstępnych eksperymentów, które wykazały całkowitą niewrażliwość bakterii tumorotwórczej na działanie CCC w zakresie stężeń 5×10^{-5} — $5 \times 10^{-1} M$.

Związek ten działa więc przez zakłócanie metabolizmu i hamowanie wzrostu tkanek rakowatych, a nie przez niszczenie patogena, czy też zapobieganie przekształcaniu tkanek normalnych w tumorowe. Istnieją dowody, że retardanty wywołują obniżenie poziomu auksyny w roślinach (Kuraishi, Muir 1963), mogą również hamować biosyntezę giberelin (Kende, Ninnemann, Lang 1963).

WNIOSKI

1. Roztwory CCC w stężeniach 5×10^{-2} , 5×10^{-3} M hamowały tworzenie się tumorów u roślin *H. annuus* L.
2. Silne hamowanie wzrostu tumorów obserwowano zarówno przy spryskiwaniu całych roślin jak i przy zakładaniu tamponów nasyconych roztworem CCC na miejsca inokulowane *Agrobacterium tumefaciens*.
3. Najślabszy efekt antytumorowy otrzymano przez jednorazowe podlanie roślin doświadczalnych roztworem CCC o stężeniu 5×10^{-2} M.
4. CCC zapobiegało formowaniu się tumorów, jeśli działanie jego na rośliny miało miejsce przed infekcją lub też kilka dni po inokulacji.
5. Bakterie tumorotwórcze (*Agrobacterium tumefaciens*) wykazały całkowitą niewrażliwość na działanie CCC w zakresie stężeń 5×10^{-5} — 5×10^{-1} M.
6. Przypuszcza się, że antytumorowa aktywność CCC wiąże się z jego oddziaływaniem na metabolizm substancji wzrostowych rośliny, szczególnie w tkance tumorowej, gdzie ich biosynteza jest bardzo intensywna.

STRESZCZENIE

Badano wpływ chlorku chlorocholiny na wzrost tumorów bakteryjnych u roślin *Helianthus annuus* L. Całe roślinki doświadczane spryskiwano roztworami CCC, a następnie zakażano je wirulentnym szczepem *Agrobacterium tumefaciens*. W drugiej serii doświadczeń CCC stosowano lokalnie w postaci wysyconych roztworami tamponów z waty, które nakładano na miejsca inokulacji. W obydwu przypadkach stwierdzono silne hamowanie tworzenia się tumorów. Około 70% roślin doświadczalnych nie posiadało ich w ogóle, a 30% wytworzyło tylko małe tumorki. Na wszystkich roślinach kontrolnych powstały duże tumory.

Antytumorowa aktywność CCC wiąże się prawdopodobnie z obniżaniem poziomu substancji wzrostowych w zarażonych tkankach badanych roślin.

Katedra Fizjologii Roślin
Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź

(Wpłynęło: dn. 3.VII.1968 r.)

SUMMARY

This paper deals with the influence of CCC on the growth of crown-gall tumors on *Helianthus annuus* L. plants. The tested plants were sprayed with CCC solutions and then they were inoculated by *Agrobacterium tumefaciens*. In the further experiments CCC solutions were localized only in the points of infection. In both cases strong inhibition of tumor formation was observed. About 70% of tested plants were without tumors and only very small tumors were formed on the remaining 30% of plants. All control plants had big tumors.

It is possible that the antitumorous activity of CCC is connected with decreased level of growth substances in CCC-treated plants especially in the infected tissues.

LITERATURA

- Bayer M. H., Ahuja M. R., 1968, Tumor formation in *Nicotiana*: auxin levels and auxin inhibitors in normal and tumor-prone genotypes, *Planta* (Berl.), 79: 292—298
- Emdem H. F., van, 1964, Effect of CCC on the rate of increase of cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae* L.), *Nature* 201: 946—48
- Halevy A. H., 1967, Effect of growth retardants on drought resistance and longevity of various plants, *Proc. XVII Int. Hort. Congr.* 3: 277—283.
- Kende H., Ninnemann H., Lang A., 1963, Inhibition of gibberellic acid biosynthesis in *Fusarium moniliforme* by AMO-1618 and CCC, *Naturwiss* 50: 599—600
- Klein R. M., 1957, The activation of metabolic systems during crown gall tumor cell formation, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 43: 956—60.
- Klein R. M., Vogel H. H., 1956, Necessity of indoleacetic acid for the duplication of crown-gall tumor cells, *Plant Physiol.* 31: 17—21.
- Kuraishi S., Muir R. M., 1963, Mode of action of growth retarding chemicals, *Plant Physiol.* 38: 19—24.
- Marth P. C., Mitchell J. W., 1960, Plant growth suppressants with special reference to persistence of AMO-1618 in soil, *Proc. Amer. Hort. Sci.* 76: 673.
- Michniewicz M., Chromiński A., Belt H., 1967, Wpływ CCC na plonowanie i niektóre właściwości fizjologiczne i biochemiczne pszenicy Leszczyńska Wczesna, *Roczn. Nauk Roln.*, 93-A-1, 131—153.
- Michniewicz M., Kentzer T., 1965, The increase of frost resistance of tomato plants through application of CCC, *Experientia* 21: 230—231.
- Rennert A., 1965, Wzrost i hodowla in vitro tkanek z łodygi normalnej oraz tumora bakteryjnego *N. tabacum* i *C. spectabilis*, *Zesz. Nauk. UŁ. Mat.-Przyr.*, s. II, z 18, 135—145.
- Sinha A. K., Wood R. K. S., 1964, Control of *Verticillium* wilt of tomato plants with "Cycocel", *Nature* 202: 824.
- Smith B. D., Corke A. T. K., 1966, Effect of CCC on the eriophyid gall mite: *Cecidophyopsis ribis* Nal., and three fungus diseases of black currant, *Nature* 212: 643—644.
- Tahori A. S., Zeidler G., Halevy A. H., 1965, Effect of some plant growth — retarding compounds on three fungal diseases and one viral disease, *Plant Disease Reporter* 49: 9.