

Warunki tworzenia się antocjanu w tkance *Vitis vinifera* hodowanej *in vitro*

*On the conditions of anthocyanin formation in the *Vitis vinifera*
tissue cultivated in vitro*

ALICJA SŁABĘCKA - SZWEYKOWSKA

(wpł. 30. XI. 51 r.)

W s t ę p

Hodowla tkanek roślinnych *in vitro* jest jedną z najnowszych metod eksperymentalnej botaniki.

Ostateczne opracowanie tej metody przypada w udziale P. R. White'owi i R. J. Gautheretowi, którzy prawie równocześnie, 30 grudnia 1938 i 9 stycznia 1939 r. ogłosili otrzymanie trwałych hodowli tkanek roślinnych.

Hodowla tkanek roślinnych znalazła liczne zastosowania jako metoda pracy w dziedzinie zagadnień morfogenetycznych, patologii roślin i fizjologii (Gautheret R. J. 1947 i 1948).

Niniejsza praca jest próbą zastosowania tej metody do badań nad biogenezą antocjanu. Praca ta ma do pewnego stopnia charakter pionierski. Tworzenie się większych ilości antocjanu w tkance winorośli *in vitro* nie było dotychczas przez nikogo zaobserwowane. Przypadek zdarzył, że dr J. Czosnowski, usiłując z braku glukozy zastąpić ją sacharozą, użył w pożywce dość dużego stężenia tej ostatniej (około 9%, dla zrównoważenia osmotycznego 5% glukozy, na której dotąd tkankę hodowano). W efekcie otrzymał hodowle zabarwione silnie antocjanem. Ten fakt stał się punktem wyjściowym niniejszej pracy. Celem jej było zbadanie rozmaitych warunków, w jakich antocjan tworzy się w tkance winorośli, w nawiązaniu do innych badań oraz hipotez dotyczących biogenezy antocjanu.

Strona chemiczna antocjanów została opracowana wyczerpująco. Willstaetter (r. 1913 i lata następne) wyizolował i określił strukturę chemiczną szeregu podstawowych barwików anto-

cjanowych, a R o b i n s o n w r. 1931 i 32 dokonał w laboratorium syntezy kilku antocjanin.

Fizjologia antocjanów była również przedmiotem ogromnej ilości prac, jednakowoż zarówno biogeneza tych barwników, jak i rola ich w przemianie materii oraz w życiu rośliny jest wciąż jeszcze niewyjaśniona.

Najważniejszą w historii badań nad fizjologią antocjanu jest t.zw. „teoria cukrowa“ O v e r t o n a (1899). Badacz ten umieszczał rośliny wodne i lądowe w roztworach cukru i w większości wypadków stwierdził wybitnie korzystny wpływ sacharozy, glukozy i fruktozy na produkcję antocjanu. Na podstawie swych doświadczeń postawił hipotezę, że przyczyną tworzenia się antocjanu w soku komórkowym jest obecność w nim większych ilości sacharydów. Cukier występujący w nadmiarze zostaje wg. O v e r t o n a częściowo przerobiony w glukozydowe barwniki antocjanowe i z tego powodu pozostaje z nimi w ścisłym i bezpośrednim związku.

Obserwacje Overtona, że dodatek cukru do pożywki wzmacnia w roślinie syntezę antocjanu, zostały ogólnie potwierdzone (m.in. M o l l i a r d M. 1909, N o a c k K. 1922, Z a n k e r J. 1930, T h i m a n n K. V. i E d m o n d s o n Y. H. 1949). Hipoteza jego jednak nie została nigdy ściśle udowodniona (C o m b e s R. 1909, J o n e s c o St. 1921 i 1922, K a r s t e n s W. K. H. 1939 — cyt. F r e y - W y s s l i n g i B l a n k 1943, oraz T h i m a n n i E d m o n d s o n 1949).

Ostatnio F r e y - W y s s l i n g i B l a n k (1943) przeprowadzili na kiełkujących roślinach kapusty dokładne ilościowe badania nad stosunkiem antocjanu do cukru i azotu w głodowej przemianie materii i wykazali, że stały ilościowy stosunek tych substancji do siebie nie istnieje. Autorzy ci, opierając się na badaniach własnych i na badaniach poprzedników, wypowiadają się przeciwko „teorii cukrowej“. Jeżeli wogóle istnieje jakiś związek między antocjanami a cukrami, to tylko tak pośredni, jak np. sztuczny dodatek cukru — wzmożona przemiana materii — wzmożona produkcja antocjanu. W podobny sposób wyobraża sobie L i p m a a (1924, cyt. F r e y - W y s s l i n g A. i B l a n k F. 1943) mechanizm wpływu cukru na syntezę antocjanu. Przez sztuczny dodatek cukru osiągnął ten autor u kilku roślin nie tylko wzmożoną syntezę antocjanu, ale także karotenoidów. Cukier wg. L i p m a a jest tylko czynnikiem wyzwalającym syntezę antocjanu.

N o a c k K. (1922) wiąże zjawisko syntezy antocjanu z asymilacją jako procesem chemicznym. Zwrócił on uwagę na to, że

wszystkie znane czynniki, wpływające korzystnie na syntezę antocjanu (m.in. cukier także), hamują proces asymilacji, i wyraził pogląd, że w okresach słabszego nasilenia procesu asymilacji (w naturze np. wiosna i jesień) równowaga pomiędzy antocjanami a ich chromogenami (wg. niego są nimi flawonole) przesuwają się na korzyść antocjanów. Pogląd ten odnosi się jednak tylko do tkanek zielonych. W kwiatach nie znalazł N o a c k nawet rzekomych prekursorów antocjanu i uważa, że tam synteza antocjanu idzie inną drogą.

Badania nad wpływem azotu (C z a r t k o w s k i A. 1914, R e i n h o l d J. i K o c h s 1935, G a s s n e r G. i S t r a i b W. 1937) doprowadziły do zgodnych wyników, że nadmiar N w środowisku rośliny wpływa hamująco na syntezę antocjanu. G a s s n e r i S t r a i b wiążą tę sprawę z przemianą cukrową, twierdząc, że przy nadmiarze N wytworzone w roślinie cukrowce zostają natychmiast zużyte do syntezy białek. To prowadzi do obniżenia ilości cukrów w tkankach i zahamowania syntezy antocjanów.

F r e y - W y s s l i n g i B l a n k podjęli w swej wyżej już omawianej pracy (1943) także kwestię znaczenia azotu dla syntezy antocjanu w głodowej przemianie materii u kiełkujących roślinek kapusty. Wykazali oni, że żaden ilościowy stosunek między azotem całkowitym, azotem białkowym (strącalnym przy pomocy kwasu garbnikowego) i azotem rozpuszczalnym a antocjanem również nie istnieje. Fakt ten jest jeszcze jednym dowodem na niewątpliwie pośredni charakter wpływu azotu na antocjan. Pozostaje natomiast otwartą kwestia, jakimi drogami wpływ ten sięga do syntezy antocjanu.

Stwierdzono jeszcze wpływ wielu innych czynników na produkcję antocjanu i rozpatrywano je z punktu widzenia różnych teorii. Najważniejsze z tych czynników są światło i temperatura.

Znane są przykłady tworzenia się antocjanu w ciemności. M o l i s c h H. (1928) opisał występowanie antocjanu w stożkach wzrostu korzeni u przedstawicieli kilku rodzin (*Crassulaceae*, *Saxifragaceae*, *Compositae* i in.). N o a c k K. (1922) stwierdził powstawanie antocjanu w ciemności u kwiatów *Victoria regia* i *Cobaea scandens*. Kielki kapusty, hodowane przez F r e y - W y s s l i n g a i B l a n k a (1943) w ciemności, również tworzyły antocjan.

W zasadzie jednak światło jest bardzo istotnym czynnikiem syntezy antocjanu (J o n e s c o S t. 1922, N o a c k K. 1922, G a s s n e r G. i S t r a i b W. 1930, Z a n k e r J. 1930,

Floren G. 1941, Thimann K. W. i Edmondson Y. H. 1949). Wpływ światła, badany na roślinach zielonych, był dawniej również rozpatrywany w związku z teorią cukrową syntezy antocjanów. W r. 1922 Noack, a w nowszych czasach Kuilman w r. 1930 i Karstens w r. 1939 (cyt. Frey-Wyssling A. i Blank F. 1943) wyrazili na podstawie swych doświadczeń pogląd, że dla tworzenia się antocjanu, obok procesów chemicznych, niezbędna jest także pewna reakcja fotochemiczna.

Wielu autorów stwierdziło dodatni wpływ niskiej temperatury na produkcję antocjanu (m.in. Overton E. 1899, Gertz O. 1907, Combes R. 1909, Molisch H. 1918, Zanker J. 1930, Gassner G. i Straib W. 1930). Overton tłumaczy fakt ten przy pomocy swej teorii cukrowej w ten sposób, że niska temperatura powoduje zwolnienie tempa przemiany cukrów oraz oddychania, a nagromadzone cukry powodują z kolei wzmożoną syntezę antocjanów.

Jednakowoż nie okazało się, aby zjawisko dodatniego wpływu niskiej temperatury na tworzenie się antocjanu miało znaczenie ogólne. Wyszło na jaw wiele faktów całkowicie odmiennych, a mianowicie, że w wielu przypadkach zwyżka temperatury wpływa korzystnie na syntezę antocjanu. Fakty te stwierdzili R. Harder (1938), G. Floren (1941), i ostatnio A. Frey-Wyssling i F. Blank (1943). Ostatni z tych autorów wyrażają pogląd, że rośliny posiadają pewne optimum temperatury dla syntezy antocjanu, które, być może, pokrywa się z optymalną temperaturą dla całej przemiany materii. Istnieje możliwość, że optimum to dla pewnych roślin przypada na niższe, dla innych na wyższe temperatury.

Dla uzupełnienia niniejszego przeglądu badań nad antocjanami należy jeszcze wspomnieć o prekursorach antocjanu i ich przemianie w antocjaninę. Powszechne w przyrodzie występowanie flawonoli obok antocjanów skłoniło Miss Wheldale do postawienia hipotezy, że flawonole są prekursorami antocjanów. Hipoteza ta została ogólnie potwierdzona i przyjęta (R. Willstaetter, Jonesco St. 1922, Noack K. 1922, Harder R. 1938), jednak w nowszych czasach podana w wątpliwość. Przeczą jej prace R. Robinsona i prace A. Kozłowskiego (1935 i 1937), który izolował chromogeny antocjanów i nie stwierdził ich identyczności z flawonolami. Identyfikowanie antocjanogonów z flawonolami R. Robinson (1935)) określa wręcz jako „an unfortunate obsession of plant physiologists“.

W związku z antocjanogenami toczyła się jeszcze jedna dyskusja. Chodziło o to, czy antocjany powstają ze swych chromogenów przez redukcję, czy przez utlenienie. Miss *W heldale* w r. 1909 (cyt. *Kozłowski A.* 1935) oraz *Keeble i Armstrong* w r. 1912 (cyt. *Frey-Wyssling A. i Blank F.* 1943) zauważyli związek, jaki istnieje między występowaniem oksydaz w roślinie a tworzeniem się antocjanu i wyrazili zdanie, że antocjany powstają ze swych prekursorów przez utlenienie. Także *M. Molliard* (1909) stwierdził konieczność tlenu dla powstawania antocjanu. Procesom oksydacyjnym przypisuje również *R. Combes* (1911) zasadniczą rolę w powstawaniu antocjanu.

Everest w r. 1914 i później *Willstaetter* (cyt. *A. Kozłowski* 1935), działając na flawonole środkami redukującymi, otrzymali z nich czerwone barwiki, które *Willstaetter* utożsamiał z antocjanami. Na tej podstawie ogłosił *Willstaetter* swą hipotezę, że flawonole są prekursorami antocjanów i przechodzą w nie na drodze redukcji. Teoria ta została ogólnie przyjęta i potwierdzona (*Noack K.* 1922). Jednak w ostatnich czasach kwestię podjęto na nowo i przytoczono szereg argumentów na korzyść teorii oksydacyjnej (*Kozłowski A.* 1935, *Robinson R.* 1935, *Frey-Wyssling A. i Blank F.* 1943). Ostatnia praca *Y. H. Edmondsona i K. V. Thimanna* (1950) wykazała znaczenie i pośrednictwo miedzi w syntezie antocjanu. Jest bardzo prawdopodobne, że miedź stanowi tu grupę prostetyczną jakiegoś enzymu, i nie jest wykluczone, że enzymem tym jest tyrozynaza lub oksydaza polifenolowa.

Z powyższego przeglądu widać, jak daleko są jeszcze fizjologowie od poznania i zrozumienia fizjologii antocjanów. W niektórych kwestiach, jak np. w zagadnieniu antocjanogenów, panuje wręcz chaos.

Przyczyny tego stanu rzeczy *K. V. Thimann i Y. H. Edmondson* (1949) dopatrują się w tym, że antocjany występują w dość niedogodnych do badania organach roślin: w kwiatach, które są utworem nietrwałym i niemożliwym do wyizolowania i których fizjologia nie jest głębiej poznana. Bardzo wiele prac dotyczących antocjanów wykonano na tkankach zielonych — pędach i liściach. Jednak asymilacja zielonej tkanki stanowi dodatkową komplikację przy rozpatrywaniu wyników doświadczeń (np. gdy chodzi o wpływ światła).

Niezwykłą wprost właściwością tkanki winorośli hodowanej *in vitro* jest fakt, że nie zawierając chlorofilu, w pewnych warunkach obficie wytwarza antocjan. Poza tym tkanki hodowane *in vitro* stanowią utwór izolowany i jednorodny pod względem morfologicznym i fizjologicznym i z tego względu *par excellence* nadają się jako materiał do rozwiązywania pewnych problemów fizjologii roślin.

Poznanie warunków, w jakich antocjan tworzy się w izolowanej i bezbarwnej tkance roślinnej, da podstawę do szczegółowych badań, które może przyczynią się do rozwiązania problemu biogenezy tego barwika.

M a t e r i a ł

Tkanka *Vitis vinifera* użyta jako materiał w niniejszej pracy została wyizolowana przez G. M o r e l a w r. 1944 w Paryżu. Do Poznania przywiózł ją w r. 1948 dr J. Czosnowski.

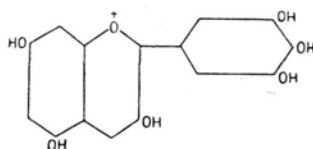
Istnieją trzy odmiany tkanki *Vitis vinifera* hodowanej *in vitro*: normalna, tumor chemiczny i tumor bakteryjny (C z o s n o w s k i J. 1952 A). Tkanka normalna, użyta w doświadczeniach nad antocjanem, przedstawia się jako biała, zbita, bezkształtna masa, o nierównej, pokrytej protuberancjami powierzchni. Bardzo rzadko pojawia się w jakimś jej miejscu zabarwienie lekko zielonawe (chlorofil) lub różowe (antocjan).

Jej struktura anatomiczna jest dość zróżnicowana. Stanowi ją zasadnicza tkanka parenchymatyczna, w której różnicują się nieregularnie rozmieszczone merystematyczne gniazda. Gniazda te rozciągając się tworzą w tkance pasma przypominające kambium. Kambium to odkłada po jednej stronie elementy drewna (mięksisz i nietypowe, krótkie naczynia) i po drugiej stronie elementy łyka (wyłącznie komórki mięksiszu, nie różniące się od zasadniczej parenchymatycznej tkanki).

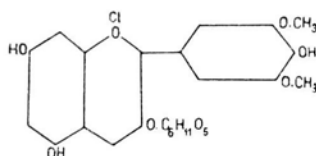
Z pośród trzech typów tkanki *Vitis vinifera* tkanka „normalna“ jest pod względem anatomicznym i fizjologicznym najbardziej zbliżona do rośliny macierzystej. Zachowuje także pewnego rodzaju roczny rytm rozwoju, który obserwujemy od trzech lat, tj. przez cały czas hodowania tkanki w Zakładzie Botaniki Ogólnej Uniwersytetu Poznańskiego. Począwszy od czerwca aż do października rozwój tkanki jest bardzo słaby. Od października do lutego tkanka rośnie ze średnią intensywnością. W okresie od lutego do połowy maja osiąga rozwój maksymalny. Ta właściwość tkanki sprawia, że w różnym czasie dokonane na niej doświadczenia nie są porównywalne. Zmiany wa-

runków, najczęściej z optymalnych na sub- lub supra-optymalne, jak to miało miejsce w niniejszej pracy, tkanka znosi najlepiej w okresie dla rozwoju najkorzystniejszym. W innych okresach doświadczenia albo w ogóle się nie udawały (pod wpływem zmienionych, niekorzystnych warunków tkanka przybierała wygląd niezdrowy i często marniała), albo też dawały wyniki nie tak kontrastowe, gdyż różnice w produkcji antocjanu były mniejsze. W optymalnym okresie rozwoju na zmienione warunki hodowli tkanka odpowiadała zmianami w ilości produkowanej świeżej masy, w % suchej masy, w ilości antocjanu i ilości cukru w tkance, zachowując przy tym zdrowy wygląd i bujny rozwój.

Barwikiem antocjanowym u *Vitis vinifera* jest oenina (W i l l s t a e t t e r R. i Z o l l i n g e r E. H. 1915). Podstawą aglukonu oeniny jest delfinidyna, jedna z trzech zasadniczych antocjanidyn, będąca heksahydroksy-fenylo-benzo- γ -pirylium o wzorze:



Oenina jest dwumetylo-delfinidyno-3-monoglukozydem = malwidyno-3-monoglukozydem (R o b i n s o n R. 1935). Wzór chlorku oeniny jest następujący:



W celu zidentyfikowania antocjanu tkanki hodowanej in vitro porównano go z chlorkiem oeniny, ponieważ z dużym prawdopodobieństwem należało przypuszczać, że w trakcie hodowli nie nastąpiły zmiany w jakości barwika. Jako cechy charakterystycznej użyto widma absorbcyjnego obydwu barwików. Oeninę w postaci chlorku wyizolowano z winogron metodą stosowaną przez W i l l s t a e t t e r a (1915) (opis jej podany jest w rozdziale „Metodyka“). Do pomiaru użyto roztworu chlorku oeniny w metanolu z HCl. Przy pomocy takiej samej mieszaniny metanolu z HCl wyekstrahowano antocjan z tkanki. pH roztworów wynosiło 2,2.

Pomiaru widma dokonano przy pomocy spektrofotometru fotoelektrycznego typu Coleman Junior.

Krzywa gęstości optycznej (gęstość optyczna = ekstynkcja = ujemny logarytm z przepuszczalności światła) nie jest identyczna dla obydwu barwików (fig. 1). Wierzchołek krzywej dla barwika tkanki jest przesunięty, w stosunku do chlorku oeniny o 15 m μ długości fali w kierunku fioletu.

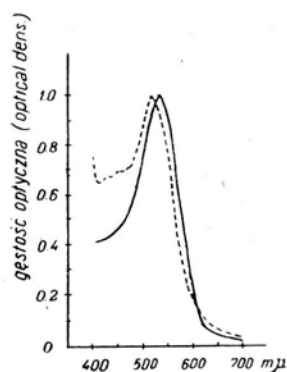


Fig. 1.

Jest to spowodowane albo tym, że barwik tkanki posiada nieco inną strukturę niż oenina, albo też tym, że w ekstrakcie barwika zawarte są pewne ko-pigmenty, wpływające na jego spektrum absorbcyjne. Wiadomo oddawna, że barwę roztworu antocjanyń zmienia obecność śladów soli żelaza, aluminium i innych metali. M. T h o m a s w swym podręczniku „Plant Physiology“ (London 1947, J. A. Churchill Ltd.) przytacza doświadczenia z chlorkiem oeniny G. M. R o b i n s o n i R. R o b i n s o n a (ogłoszone w Biochem. J. 1931, 25, 1687), z których wynika, że także substancje organiczne

i to m. in. takie, jak powszechnie obecne w soku komórkowym garbniki i substancje flawonowe, mogą działać jako ko-pigmenty.

Wysoka absorbcja w okolicy ultrafioletu jest prawdopodobnie spowodowana obecnością barwików flawonowych w ekstrakcie (por. T h i m a n n K. V. i E d m o n d s o n Y. H. 1949).

M e t o d y k a

1. Hodowla tkanek.

Pożywka zasadnicza, na której hodowano tkanki, posiadała skład następujący:

(Basic medium):

agar	10,00 g
glukoza (glucose)	30,00 g
Ca(NO ₃) ₂	0,50 g
KNO ₃	0,25 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,25 g
Fe, Mn, J, Ni, Co,	

Ti, Zn, Cu, Be, B	ślady* (traces*)
cysteina (cysteine hydrochloride)	10,0 mg
tiamina (thiamine hydrochloride)	1,0 mg
kw. β -indolo-octowy (β -indolylacetic acid)	0,1 mg
H ₂ O	1000,0 ml

W poszczególnych doświadczeniach pożywka ta była rozmaicie modyfikowana.

Hodowle przeprowadzano w probówkach o wymiarach 12 cm dł. \times 2 cm średnicy dając do nich po 12 ml pożywki.

Przeszczepień materiału dokonywano co 6 tygodni. Wyszczepień tkanek na kultury doświadczalne dokonywano w ten sam sposób, co przeszczepień materiału, z tym tylko, że wyszczepiano większe fragmenty tkanek. Tkanki wyszczepione w większych fragmentach rozwijają się lepiej, co jest ważne z tego względu, że hodowle doświadczalne odbywają się nieraz w warunkach dalekich od optymalności.

Probówki zatknięte tamponem z waty owijano jeszcze szczelnie kapturkiem z celofanu.

Hodowle rozwijały się w specjalnym pokoju hodowlanym, w którym utrzymywano stałą temperaturę (20°C) i stałą wilgotność (60%). Szyby okna zasłonięte były matowym, pergaminowym papierem dla ochrony hodowli przed zbyt intensywnym światłem słonecznym.

Dla każdego doświadczenia przeprowadzano 12—24 hodowli równoległych. Czas każdej hodowli wynosił 6 tygodni.

* Zmodyfikowany roztwór mikroelementów wg B e r t h e l o t a:
(Modified microelements solution after B e r t h e l o t :)

H ₂ O	1000,00 ml
Fe ₂ (SO ₄) ₃	50,00 g
MnSO ₄ · 7 H ₂ O	2,00 g
KJ	0,50 g
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	0,05 g
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,05 g
TiSO ₄	0,20 g
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,10 g
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,05 g
BeSO ₄ · 4 H ₂ O	0,10 g
H ₃ BO ₃	0,05 g
H ₂ SO ₄ c. w. l. (d) 1,84	1,00 ml

Na 1 l pożywki bierze się 0,5 ml powyższego roztworu.

(0,5 ml of this solution was added to 1 l of nutrient solution)

2. Oznaczanie świeżej i suchej masy.

Po 6 tygodniach hodowli w danych warunkach doświadczenia tkanki wyjmowano z probówek i ważono wszystkie razem. Wagę dzielono przez ilość kultur. Następnie tkanki płukano w silnym strumieniu wody wodociągowej i obkrawano dla usunięcia z powierzchni resztek agaru. Każdą tkankę dzielono na dwie części: jedna służyła do oznaczania % suchej masy, druga do oznaczania ilości antocjanu.

Część pierwszą ważono, następnie umieszczano w szalkach i wstawiono na 24 h do suszarki o temp 80°C. Po ostudzeniu w eksykatorze tkanki powtórnie ważono. Z wyników obu ważeń wyliczano % suchej masy tkanki. Suche tkanki przechowano w eksykatorze i użyto do oznaczenia ilościowego cukrów.

3. Oznaczanie antocjanu.

Część drugą tkanek również ważono, następnie zalewano w moździerz 15 ml mieszaniny metanolu z HCl (w stos. 5 : 1), rozcierano, przenoszono do probówki, moździerz płukano jeszcze 5 ml mieszaniny $\text{CH}_3\text{OH} + \text{HCl}$ i przepłuczyny dodawano do wyciągu. Wyciąg wirowano i klarowny ekstrakt zlewano do nowej probówki.

Zawartość antocjanu w wyciągu oznaczano kolorymetrycznie mierząc absorpcję światła przy pomocy kolorymetru fotoelektrycznego Langego. Na zakończenie mierzono pH wyciągu, posługując się jonometrem, gdyż wszelkie próby zastosowania roztworu buforowego do ekstrahowania barwika zawiodły. Przy zetknięciu z buforem barwik natychmiast odbarwiał się. Podobnie chlorek oeniny nie rozpuszczał się w żadnym z kilku zastosowanych buforów, jakkolwiek w wodzie destylowanej rozpuszczał się doskonale.

Pomimo niezgodności spektrum absorbcyjnego oeniny i barwika tkanki ilość antocjanu w tkance wyrażano w mg oeniny. Różnice bowiem obu spektrów są niewielkie i można przyjąć, że są spowodowane obecnością w ekstrakcie pewnych ko-pigmentów. Wynikły stąd błąd pomiarów również jest niewielki i jednakowy dla wszystkich oznaczeń.

Chlorek oeniny wypreparowano metodą R. Willstaettera i E. H. Zollingera (1915) w sposób następujący:

Skórki czarnych winogron zalano na przeciąg 1 tygodnia 2-krotną ilością lodowatego kwasu octowego. Przefiltrowany wyciąg zadano 3-krotną ilością eteru etylowego. Osad, przemyty i uwolniony od eteru, rozpuszczano w wodzie z HCl. Przesączony roztwór zadano wodnym roztworem kwasu pikrynowego. Pikrynian oeniny roz-

puszczono w metanolu z HCl i następnie wytrącono eterem chlorek oeniny.

pH wyciągów antocjanowych wahało się od 1,8 do 2,7. Ponieważ absorbcja światła przez antocjan jest silnie zależna od pH (fig. 2) (por. S o n d h e i m e r E. i K e r t e s z Z. I. 1948), przeto przyrządzono kilka szeregów różnych stężeń oeniny o różnym pH i zmierzono ich absorbcję w kolorymetrze Langego (fig. 3).

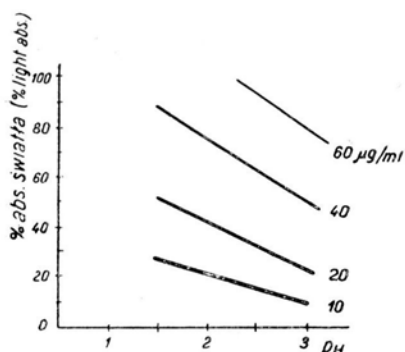


Fig. 2.

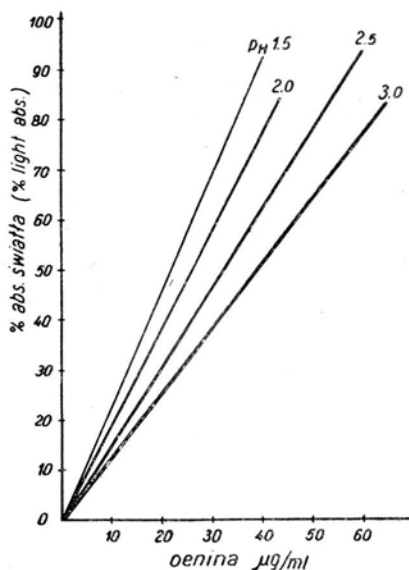


Fig. 3.

Z otrzymanych danych wykreślono krzywe absorpcji oeniny dla przedziału 1,8—2,7 pH w odstępach co 0,2 pH. Z tych krzywych odczytywano ilość barwika w wyciągu i następnie przeliczano ją na 1 g świeżej masy tkanki.

4. Oznaczanie cukrów.

Przy oznaczaniu cukrów zastosowano metodę Hagedorna-Jensena, według opisu zawartego w „Praktikum po fizjologii roślinii“ S k a z k i n a (1948). Zasada tej metody jest następująca:

$K_3Fe(CN)_6$ w nadmiarze utlenia cukier, przechodząc w $K_4Fe(CN)_6$. $K_4Fe(CN)_6$ zostaje usunięte z roztworu przez strącenie $K_2Zn_3/Fe(CN)_6/2$ przy pomocy $ZnSO_4$. Nadmiar $K_3Fe(CN)_6$ utlenia

w kwaśnym roztworze KJ. KJ wydziela J wolny, który miareczkujemy tiosiarczanem.

Rozpuszczalne cukry ekstrahowano z suchej i sproszkowanej tkanki (10—15 mg) przez ogrzewanie z wodą w temp. 70°C na łaźni wodnej. Białka wytrącano z wyciągu przez dodatek 5 ml 4,5% $ZnSO_4$ + 3 ml 2% NaOH.

Próby na cukry redukujące zadawano od razu n/200 roztworem $K_3Fe(CN)_6$ + Na_2CO_3 , ogrzewano 15' na wrzącej łaźni wodnej, następnie dodawano roztworu $ZnSO_4$, KJ, CH_3COOH i skrobi i miareczkowano n/200 tiosiarczanem sodu. Z ilości zużytego tiosiarczanu odczytywano w tablicach ilość cukru (jako glukozy).

Próby na polisacharydy rozpuszczalne hydrolizowano, dodając do 5 ml wyciągu 0,5 ml HCl stęż. i ogrzewając na łaźni wodnej w temp. 70°C przez 8' (Lehmann O. 1931, Frey-Wyssling A. i Blank F. 1943). Po zneutralizowaniu próby przy pomocy NaOH w dalszym ciągu postępowano z nią, jak przy oznaczaniu cukrów redukujących.

I. WPLYW CUKRÓW

A. Wzrost i sucha masa tkanki.

Przy dobieraniu stężeń cukrów kierowano się tym, by stężenie najniższe nie wywoływało lub prawie nie wywoływało produkcji antocjanu, zaś stężenie najwyższe nie zabijało tkanki.

/glukoza + fruktoza w stos. 1 : 1/ oznacza, że na dane stężenie składają się po połowie obydwie te cukry. Np. /glukoza + fruktoza/ — 6% oznacza, że glukozy jest 3% i fruktozy 3%, razem 6%.

Wnioski, jakie nasuwają się przy rozpatrywaniu danych tabelki (tabela 1), są następujące:

a) Działanie ilościowe.

1. Wraz ze wzrastającymi stężeniami cukrów (począwszy od optymalnego, którym jest najniższe z użytych) maleje produkcja świeżej masy (wzrost mg/kult.).
2. W miarę wzrostu stężenia cukru wzrasta % suchej masy, a maleje zawartość wody w tkance. Jest to przypuszczalnie spowodowane coraz to silniejszą akumulacją cukrów w tkance oraz stopniową zwyżką ciśnienia osmotycznego w pożywce, które utrudnia pobieranie wody.

TABELA 1 — TABLE 1

Pożywka (medium)			Tkanka (tissue)		
Cukier (sugar)	% cukru (conc., %)	konc. M/l (conc., M.)	wzrost mg/kult. (growth, mg/cult.)	% suchej masy (dry weight, %)	sucha masa mg/kult. (dry weight, mg/cult.)
glukoza (glucose)	3	0,165	1620	6,8	110
	6	0,330	725	16,1	116
	9	0,495	401	30,3	121
	12	0,660	430	28,0	120
fruktoza (fructose)	3	0,165	544	10,0	54
	6	0,330	443	16,8	74
	9	0,495	289	23,6	68
	12	0,660	263	27,9	73
glukoza + fruktoza w stos. 1:1 (gluc. + fruct in prop. 1:1)	3	0,165	1096	6,0	66
	6	0,330	523	20,4	106
	9	0,495	358	26,0	93
	12	0,660	288	32,5	93
sacharoza (sucrose)	3	—	—	—	—
	6	0,174	690	13,5	93
	9	0,261	481	19,1	92
	12	0,348	374	25,0	93

3. Produkcja suchej masy (sucha masa/kult.) jest niezależna od stężenia cukru i zawsze jednakowa (w granicach błędu doświadczenia). Wyjątek stanowią niższe stężenia fruktozy (0,165 M), co być może spowodowane jest tym, że stężenie fruktozy 0,165 M nie jest jeszcze optymalne dla wzrostu tkanki. Różnice we wzroście tkanki, jakie wychodzą, gdy rozpastrywać produkcję świeżej masy w zależności od stężenia cukru, są tylko pozorne i wydają się polegać jedynie na różnicach w uwodnieniu tkanki.

b) Działanie jakościowe.

Glukoza okazała się znacznie użyteczniejsza w odżywianiu tkanki, aniżeli fruktoza. Widać to z różnic w produkcji zarówno świeżej, jak i suchej masy tkanki.

Gdy porównywać sacharozę z ekwimolarną ilością /glukozy z fruktozą/, uderza jej niekorzystny wpływ na produkcję świeżej masy (wzrost). Staje się to jednak zupełnie zrozumiałe, gdy weźmie się pod uwagę podwójność cząsteczki sacharozy. Gdy się porówna działanie cukrów w ich stężeniach procentowych, wychodzi na jaw fakt odmienny: korzystniejszy wpływ sacharozy. To zjawisko można uważać za wynik korzystniejszego ciśnienia osmotycznego sacharozy, niż takiej samej wagowo ilości cukrów prostych.

Że w gruncie rzeczy wzrost na sacharozie jest taki sam, jak na glukozie z fruktozą, świadczy fakt, że produkcja suchej masy jest w obydwu przypadkach mniej więcej taka sama. Z tabelki w punkcie C okaże się również, że nie ma między tymi cukrami większych różnic w gromadzeniu sacharydów w soku komórkowym.

B. Produkcja antocjanu

TABELA 2—TABLE 2

Pożywka (medium)			Tkanka (tissue)		
Cukier (sugar)	stęż. ‰ (conc., ‰)	stęż. M/l (conc., M.)	antocjan µg/g św. m. (anthocyanin µg/g fresh weight)	antocjan µg/g s. m. (anthocyanin µg/g dry w.)	antocjan µg/kult. (anthocyanin µg/cult.)
glukoza (glucose)	3	0,165	0	0	0
	6	0,330	87	539	63
	9	0,495	645	2129	258
	12	0,660	896	3266	385
fruktoza (fructose)	3	0,165	0	0	0
	6	0,330	184	1104	82
	9	0,495	404	1697	117
	12	0,660	686	2470	180
glukoza + fruktoza (glucose + fructose)	3	0,165	0	0	0
	6	0,330	238	1166	124
	9	0,495	587	2231	210
	12	0,660	716	2220	206
sacharoza (sucrose)	3	—	—	—	—
	6	0,174	44	326	30
	9	0,261	277	1440	133
	12	0,348	480	1920	180

Ilość antocjanu wzrasta w miarę postępującej koncentracji cukru w pożywce (tabela 2). Ponieważ równocześnie maleje produkcja świeżej masy w tkance (związana z ubytkiem wody), zachodzi pytanie, czy zwiększona koncentracja antocjanu nie jest prosto związana z ogólną koncentracją soku komórkowego. Gdy rozważyć ilości antocjanu przypadające na 1 g suchej masy, (której produkcja jest niezależna od stężenia cukru) i na całą kulturę, odpowiedź wypada prze-

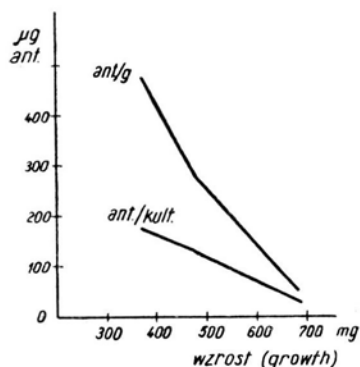


Fig. 4.

cząco. Jest oczywiste, że w miarę wzrastającego stężenia cukru w pożywce następuje synteza, a nie tylko proste skoncentrowanie antocjanu. Gdy jednak z kolei wykreślić krzywe zależności między produkcją (antocj./kult.) i koncentracją (antocj./g) antocjanu a wzrostem tkanki (fig. 4), widać, że krzywa koncentracji spada bardziej stromo niż krzywa produkcji, w zależności od wzrostu. Zwykła fizykalna koncentracja antocjanu w soku komórkowym jest więc również w pewnym stopniu odpowiedzialna za zwiększoną koncentrację barwnika w tkance.

Reasumując, można powiedzieć: Silniejsze stężenia antocjanu na wzrastających stężeniach cukru są w pewnym stopniu związane z „zagęszczeniem się” tkanki, z jej ubożeniem w wodę. Drugim, zasadniczym czynnikiem jest tu jednak produkcja antocjanu, której wysokość wzrasta zależnie od ilości cukru w pożywce.

Porównanie jednakowych stężeń glukozy i fruktozy w ich wpływie na tworzenie się antocjanu wypada znów na korzyść glukozy.

Porównanie /glukozy i fruktozy/ z sacharozą daje podobny, lecz odwrócony wynik, jak przy rozpatrywaniu ich wpływu na wzrost: gdy wziąć pod uwagę roztwory molowe, sacharoza działa korzystniej, gdy procentowe — /glukoza + fruktoza/. Częściowe wy tłumaczenie tych faktów dały analizy cukrów, gromadzonych w tkankach.

C. Gromadzenie cukrów w tkance

Gromadzenie cukru w tkance jest tym większe, im silniejsze jest jego stężenie w pożywce (tabela 3).

Stosunek nagromadzonych monosacharydów do polisacharydów nie zależy od tego, czy w pożywce znajdował się cukier prosty, czy

TABELA 3 — TABLE 3

Pożywka (medium)			Tkanka (tissue)			
cukier (sugar)	stęż., ‰ (conc., ‰)	stęż., M (conc., M)	cukry rozpuszczalne (soluble sugars)			w ‰ s.m. (in ‰ of dry weight)
			w ‰ św. m. (in ‰ of fresh w.)			
			monosach. (mono- sacch.)	polisach. (polysacch.)	razem (together)	
glukoza (glucose)	3	0,165	1,3	0,0	1,3	38,4
	6	0,330	5,0	0,8	5,8	36,1
	9	0,495	7,2	1,9	9,1	31,1
	12	0,660	11,7	2,0	13,7	42,8
fruktoza (fructose)	3	0,165	2,2	0,2	2,4	24,7
	6	0,330	3,7	0,9	4,6	27,6
	9	0,495	7,6	1,0	8,6	36,7
	12	0,660	8,4	2,2	10,6	38,0
/glukoza + fruktoza/ (glucose + fructose)	3	0,165	1,6	0,1	1,7	27,3
	6	0,330	3,2	1,1	4,3	21,1
	9	0,495	6,2	1,2	7,4	28,4
	12	0,660	11,7	1,8	13,5	38,1
sacharoza (sucrose)	3	—	—	—	—	—
	6	0,174	3,7	0,3	4,8	31,1
	9	0,261	6,3	0,5	6,8	35,4
	12	0,348	7,4	0,7	8,1	32,3

złożony. Wprost przeciwnie, ilość polisacharydów w przypadku sacharozy jest nieco mniejsza, niż w przypadku glukozy i fruktozy. Pobrane cukry tkanka przechowuje w soku komórkowym w formie niezależnej od tej, w jakiej go otrzymała. Fakt ten stwierdzono później przy wszystkich analizach cukrów, jakie były robione z okazji innych doświadczeń. Z tego powodu w dalszym ciągu pracy nie przedstawiano osobno cukrów prostych i złożonych, ale łączono je razem jako cukry rozpuszczalne.

Glukoza powoduje na ogół silniejszą akumulację cukrów rozpuszczalnych aniżeli fruktoza. Zastosowanie sacharozy daje również większą ilość cukrów w tkance, niż zastosowanie ekwimolarnego stężenia /glukozy z fruktozą/. Fakt ten łatwo wytłumaczyć podwójnością cząsteczki sacharozy, która w komórce zostaje rozbita na dwie

cząsteczki cukrów prostych. Sacharoza porównana z takim samym stężeniem procentowym /glukozy z fruktozą/ powoduje jednak słabszą akumulację cukrów niż jej proste komponenty. W tym przypadku glukoza i fruktoza są widocznie w większych ilościach pobierane przez tkankę niż sacharoza, przypuszczalnie ze względu na silniejsze ciśnienie osmotyczne, jakie wywierają.

Ciekawe są cyfry odnoszące się do zawartości cukrów w suchej masie tkanki. Cyfry te niewiele się różnią między sobą i nie wykazują żadnej regularności. Można przyjąć, że % cukru w suchej masie tkanki nie jest zależny od stężenia cukru, na którym tkanka rośnie. Oczywiście odnosi się to tylko do stężeń użytych w niniejszych doświadczeniach. Inne doświadczenie, o którym będzie mowa później, wykazało, że % cukrów rozpuszczalnych w suchej masie tkanki roś-

TABELA 4 — TABLE 4

Pożywka (medium)			Tkanka (tissue)		
Cukier (sugar)	stęż. % (conc., %)	stęż. M (conc., M)	cukier mg/g św. m. (sugar mg/g fresh w.)	antocjan μg/g św. m. (anthocyanin μg/g fresh w.)	stos. ant.: cukier (ratio anth.: sugar)
glukoza (glucose)	3	0,165	13	0	—
	6	0,330	58	87	1 : 669
	9	0,495	91	645	1 : 141
	12	0,660	137	896	1 : 153
fruktoza (fructose)	3	0,165	24	0	—
	6	0,330	46	184	1 : 252
	9	0,495	86	404	1 : 214
	12	0,660	106	686	1 : 154
(glukoza + fruktoza/ glucose + fructose)	3	0,165	17	0	—
	6	0,330	43	238	1 : 181
	9	0,495	74	587	1 : 126
	12	0,660	135	716	1 : 188
sacharoza (sucrose)	3	—	—	—	—
	6	0,174	40	44	1 : 910
	9	0,261	68	277	1 : 244
	12	0,348	81	480	1 : 168

nie w miarę zwiększających się stężeń cukru w pożywce aż do stężenia optymalnego dla wzrostu tkanki. Poczawszy od tego stężenia, dalsze gromadzenie cukrów w suchej masie tkanki nie następuje.

D. Ilość cukrów w tkance a ilość antocjanu

Ogólnie można powiedzieć, że ilość antocjanu wzrasta wraz ze wzrastającą zawartością cukrów w tkance (tabela 4). Fakt ten, na pierwszy rzut oka, przemawiałby na korzyść teorii Overtona o bezpośrednim i ścisłym związku między ilością cukru w tkance a ilością antocjanu. Dokładna ilościowa analiza wyników nie pozwala jednak na tak prostą ich interpretację.

1. Nawet w odniesieniu do świeżej masy tkanki stosunek „antocjan: cukier“ jest dość niestały i nieregularny. Na ogół można powiedzieć, że dla wzrastających koncentracji cukru w tkance stopniowo maleje, bardzo często jednak, dla jednakowych koncentracji cukru w tkance, wykazuje duże różnice (p. tabela 4).

2. Odniesienie ilości cukrów i antocjanu do suchej masy tkanki wykazało, że podczas gdy ilości antocjanu rosną, ilości cukru nie pozostają z nimi w żadnej proporcji i prawie się nie zmieniają (tabela 5).

TABELA 5 — TABLE 5

Pożywka (medium)		Tkanka (tissue)	
Cukier (sugar)	stęż., M (conc., M)	antocjan, mg/g s. m. (anthocyanin, mg/g dry w.)	cukier, mg/g s. m. (sugar, mg/g dry weight)
glukoza (glucose)	0,165	0,00	384
	0,330	0,54	361
	0,495	2,13	311
	0,660	3,27	428
fruktoza (fructose)	0,165	0,00	247
	0,330	1,10	276
	0,495	1,70	367
	0,660	2,47	380
sacharoza (sucrose)	0,174	0,33	311
	0,261	1,44	354
	0,348	1,92	323

3. Ciekawym problemem są różnice pomiędzy sacharozą i /glukozą z fruktozą/. Okazuje się, że nawet rozmaite nagromadzenie cukru w tkance nie jest w pełni odpowiedzialne za różnice w tworzeniu się antocjanu w tkankach hodowanych na tych cukrach. Ilustruje

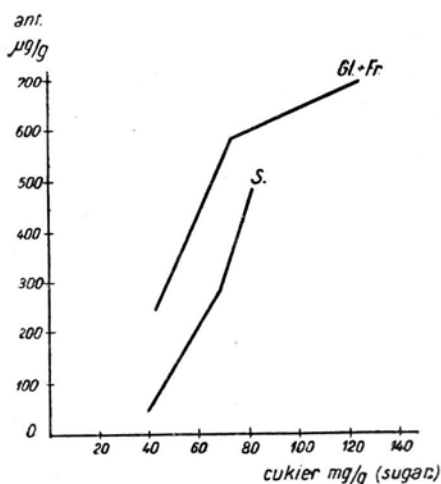


Fig. 5.

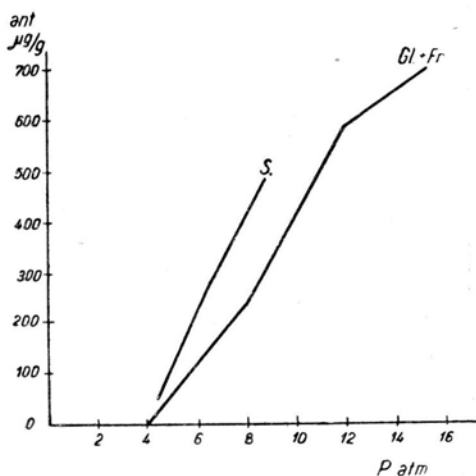


Fig. 6.

to wykres (fig. 5). Takie same ilości cukru w tkance, hodowanej na sacharozie, idą w parze z mniejszymi ilościami antocjanu niż w tkance hodowanej na /glukozie z fruktozą/. Ponieważ tkanki hodowane były poza tym w jednakowych warunkach, powodów tych różnic należy szukać w samych cukrach. Sacharozą różni się od glukozy i fruk-

toży podwójnością swej cząsteczki i w związku z tym słabszym ciśnieniem osmotycznym. Drugi wykres (fig. 6) przedstawia zależność między ciśnieniem osmotycznym wywieranym przez cukier w pożywce a ilością antocjanu w tkance. Stosunki tu przedstawiają się odwrotnie, niż na wykresie poprzednim: to samo ciśnienie osmotyczne w przypadku sacharozy wpływa korzystniej na ilość antocjanu niż w przypadku glukozy z fruktozą.

Ponieważ tkanki hodowane na różnych cukrach różnią się między sobą także uwodnieniem, a rozpuszczalne cukry i antocjan znajdują się właśnie w soku komórkowym, przeto ilości cukrów i antocjanu przeliczono jeszcze na zawartość wody w tkance, co mniej więcej równa się odniesieniu tych substancji do soku komórkowego (tabela 6).

TABELA 6 — TABLE 6

Pożywka (medium)		Tkanka (tissue)		
Cukier (sugar)	stęż. $\frac{\%}{\%}$ (conc. $\frac{\%}{\%}$)	H ₂ O $\frac{\%}{\%}$	cukier, $\frac{\%}{\%}$ H ₂ O (sugar, $\frac{\%}{\%}$ H ₂ O)	antocjan w mg $\frac{\%}{\%}$ H ₂ O (anthocyanin mg $\frac{\%}{\%}$ H ₂ O)
glukoza + fruktoza (glucose + fructose)	3	90	1,8	0
	6	83	5,2	29
	9	76	9,7	77
	12	72	18,8	99
sacharoza (sucrose)	3	—	—	—
	6	87	4,6	5
	9	81	8,3	34
	12	75	10,0	64

Krzywe wykreślone na podstawie tych danych mają wygląd podobny do poprzednich (fig. 7—8).

Wydaje się więc, że działanie wzrastających stężeń cukrów na syntezę antocjanu można przypisać dwom czynnikom: zwiększonemu ciśnieniu osmotycznemu wywieranemu na tkankę oraz gromadzeniu się w tkance dużych ilości cukrów rozpuszczalnych.

Kwestia ciśnienia osmotycznego zostanie jeszcze poruszona w następnym rozdziale pracy.

II. WPŁYW CIŚNIENIA OSMOTYCZNEGO

W związku z działaniem wzrastających stężeń cukrów na produkcję antocjanu wykonano również kilka doświadczeń nad wpły-

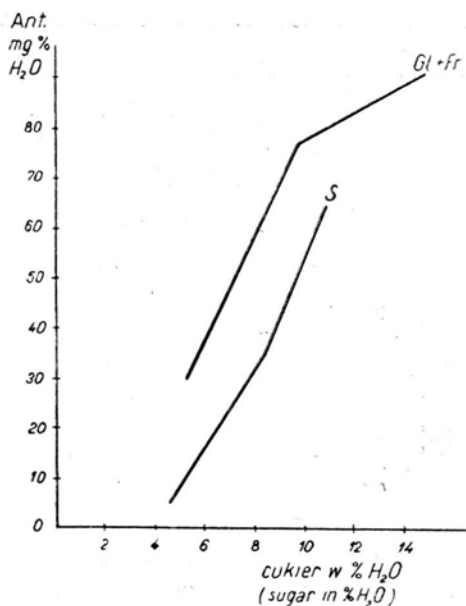


Fig. 7.

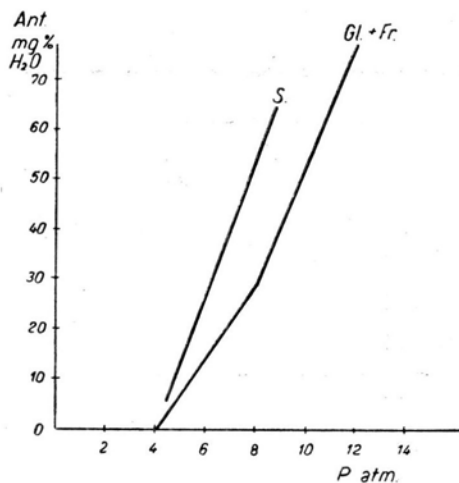


Fig. 8.

wem ciśnienia osmotycznego. Wysokość ciśnienia regulowano przez dodatek do pożywki różnych ilości NaCl. Obydwa jony chlorku sodowego nie wchodzi w skład roztworu Knopa i nie posiadają specjalnego znaczenia w metabolizmie. Ich dodatek do pożywki przypuszczalnie nie powoduje większych zmian w odżywianiu tkanki.

TABELA 7 — TABLE 7

Pożywka (medium)		Tkanka (tissue)		
sacharoza, ‰ (sucrose conc., ‰)	konc. NaCl (NaCl conc.)	wzrost, mg/kult. (growth, mg/cult.)	‰ suchej masy (dry weight, ‰)	sucha masa mg/kult. (dry weight mg/cult.)
6 P = 4,4 atm.	0,00 M P = 0 atm.	690	13,5	93
	0,05 M P = 2 atm.	462	17,8	82
	0,10 M P = 4 atm.	402	16,4	66
9 P = 6,6 atm.	0,00 M P = 0 atm.	425	21,1	90
	0,05 M P = 2 atm.	334	19,4	65
	0,10 M P = 4 atm.	338	18,2	61

Podobnie jak cukier w supraoptymalnym stężeniu, NaCl hamuje wzrost tkanki, natomiast w przeciwieństwie do cukru hamuje także produkcję suchej masy (tabela 7).

Bardzo interesująco przedstawia się wpływ NaCl-u na produkcję antocjanu (tabela 8):

TABELA 8 — TABLE 8

Pożywka (medium)		Tkanka (tissue)		
sacharoza ‰ (sucr. ‰)	konc. NaCl (NaCl conc.)	ant., µg/g św. m. (anth., µg/g fresh w.)	ant., µg/kult. (anth., µg/cult.)	ant., µg/g s. m. (anth. µg/g dry w.)
6	0,00 M	44	30	326
	0,05 M	280	129	1573
	0,10 M	128	54	780
9	0,00 M	315	134	1480
	0,05 M	503	168	2620
	0,10 M	229	77	1620

NaCl w stęż. 0,05 M wzmacnia silnie produkcję antocjanu. Przy stęż. 0,10 M ilość antocjanu znów spada, jednak spadek ten z dużym prawdopodobieństwem można przypisać toksycznemu działaniu zbyt dużych ilości chlorku sodu. Świadczy o tym niezbyt zdrowy wygląd tkanek na tym stężeniu oraz to, że na stężeniu 0,20 M większość tkanek w ogóle obumarła.

Bardzo interesująco wypadło zestawienie wpływu sacharozy z wpływem sacharozy + NaCl (fig. 9). NaCl w stęż. 0,05 M posiada taki sam wpływ na tworzenie się antocjanu, jak dodatek sacharozy w ilości wywierającej takie samo ciśnienie osmotyczne. Krzywe „ciśnienie osmotyczne — ilość antocjanu“ od zera aż do NaCl 0,05 M biegną równoległe z krzywą dla sacharozy. Późniejszy ich spadek, jak była mowa poprzednio, został przypisany szkodliwemu działaniu nadmiaru NaCl.

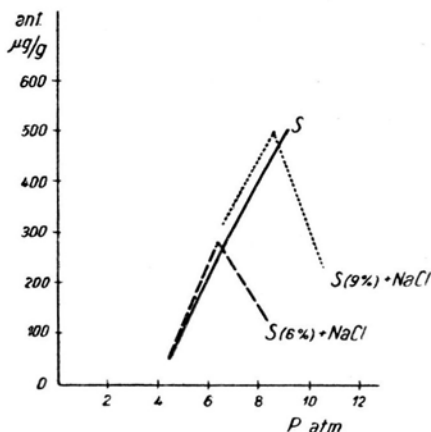


Fig. 9.

Wykonane analizy nie pozwoliły sprowadzić wpływu chlorku sodowego do wpływu zwiększonej ilości cukru w tkance. Wypadły one następująco (tabela 9):

TABELA 9 — TABLE 9

Pożywka (medium)		Tkanka (tissue)		
sach., % (sucr., %)	Konc. NaCl (NaCl conc.)	antocjan µg/g św. m. (antho- cyanin µg/g fresh w.)	cukier mg/g św. m. (sugar mg/g fresh w.)	stos. ant.: cukier (ratio anth.: sugar)
6	0,00 M	44	40	1 : 907
	0,05 M	280	39	1 : 139
	0,10 M	128	29	1 : 225
9	0,00 M	315	58	1 : 183
	0,05 M	503	66	1 : 131
	0,10 M	229	69	1 : 301

Wzrastającym ilościom antocjanu nie odpowiada wzrost ilości cukru w tkance. Stosunek „antocjan : cukier“ dla NaCl 0,05 M maleje, by później dla supra-optimalnych ilości NaCl znów silnie wzrosnąć. Wpływ ciśnienia osmotycznego na produkcję antocjanu nie idzie więc poprzez zwiększoną akumulację cukrów w tkance. Brak dokładnych badań nie pozwala jeszcze nic powiedzieć o mechanizmie jego działania. Prawdopodobnie nie jest on także związany z trudnościami w pobieraniu wody przez tkankę, na co wskazują doświadczenia nad wpływem wilgotności, których wyniki przedstawione są w rozdziale następnym.

III. WPŁYW WILGOTNOŚCI

Słowo wilgotność oznacza tutaj stopień łatwości, z jaką podłoże oddaje tkance koloidowo związaną wodę. W doświadczeniach niniejszych wilgotność pożywki regulowano przez dodawanie do niej rozmaitych ilości agaru.

Wyniki doświadczeń zebrane są w poniższej tabelce (tabela 10):

TABELA 10 — TABLE 10

Pożywka (medium)		Tkanka (tissue)			
sach., % (sucr., %)	agar, % (agar conc., %)	wzrost mg/kult. (growth mg/cult.)	sucha m., % (dry weight %)	antocjan $\mu\text{g/g}$ św. m. (anthocyanin $\mu\text{g/g}$ fresh w.)	cukier mg/g św.m. (sugar mg/g fresh w.)
6	1,0	665	12,8	44	37
	1,5	554	10,1	62	34
	2,0	440	12,3	52	45
	2,5	397	9,6	46	28
	3,0	342	8,9	ślady (traces)	27
9	1,0	425	21,1	315	58
	1,5	361	18,7	270	58
	2,0	295	16,0	320	50
	2,5	295	17,4	344	54
	3,0	268	15,7	285	49

Wraz ze wzrastającym stężeniem agaru maleje produkcja świeżej masy i % suchej masy oraz w związku z tym i produkcja suchej masy tkanki. Trudnościom w pobieraniu wody towarzyszy osłabienie pobierania składników odżywczych pożywki, stąd ogólne zaha-

mowanie wzrostu tkanki. Ilość antocjanu i cukru początkowo nie zmienia się, a przy najwyższym stężeniu agaru (3⁰/o) nieco maleje.

Wynika z tego, że wilgotność pożywki nie ma wpływu na produkcję antocjanu.

IV. W p ł y w ś w i a t ł a

Hodowle „na świetle“ stały w pełnym świetle dziennym, hodowle „w ciemności“ były okryte kapturem z czarnego papieru.

TABELA 11 — TABLE 11

Środowisko (medium)		Tkanka (tissue)		
sach., % (sucr., %)	oświetlenie (illumination)	wzrost mg/kult. (growth mg/cult.)	sucha ma- sa, % (dry weight, %)	sucha masa mg/kult. (dry weight mg/cult.)
9	ciemność (darkness)	745	18,5	138,5
	światło (light)	538	21,6	116,0
12	ciemność (darkness)	434	23,8	103,2
	światło (light)	385	26,2	100,8

Światło wpływa hamująco na wzrost tkanki i nieznacznie także obniża zawartość wody w niej (tabela 11). Natomiast synteza antocjanu wzmacnia się na świetle bardzo znacznie (tabela 12).

TABELA 12 — TABLE 12

Środowisko (medium)		Tkanka (tissue)		
sach., % (sucr., %)	oświetlenie (illumination)	antocjan μg/g św. m. (antho- cyanin μg/g fresh w.)	antocjan μg/ kult. (antho- cyanin μg/cult.)	antocjan μg/g s. m. (antho- cyanin μg/g dry w.)
9	ciemność (darkness)	125	94	678
	światło (light)	386	208	1790
12	ciemność (darkness)	229	99	962
	światło (light)	627	242	2410

Ponieważ poprzednio wykazano wpływ cukrów na tworzenie się antocjanu, interesującym będzie stwierdzenie, jak zachowują się ilości cukrów w tkance hodowanej w ciemności i na świetle (tabela 13).

TABELA 13 — TABLE 13

Środowisko (medium)		Tkanka (tissue)		
sach., % (sucr., %)	oświetlenie (illumination)	antocjan $\mu\text{g/g}$ św. m. (antho- cyanin $\mu\text{g/g}$ fresh w.)	cukier mg/g św. m. (sugar mg/g fresh w.)	stos. ant.: cukier (ratio anth.: sugar)
9	ciemność (darkness)	126	67	1 : 531
	światło (light)	386	93	1 : 241
12	ciemność (darkness)	229	80	1 : 350
	światło (light)	627	94	1 : 149

Wyniki tabelki dadzą się streścić następująco: Tkanki rosnące na świetle zawierają nieco wyższe ilości cukrów rozpuszczalnych niż rosnące w ciemności. Różnicom tym jednak w żadnym przypadku nie można przypisać roli czynnika decydującego o ogromnie wzmożonej syntezie antocjanu na świetle. Świadczy o tym stosunek antocjanu do cukru, który w ciemności jest znacznie niższy niż na świetle. Tak więc na danym stężeniu cukru wpływ światła jest niezależny od działania sacharydów. W łańcuchu przemian prowadzących do syntezy antocjanu znajduje się z pewnością jakaś reakcja fotochemiczna.

V. Wpływ niskiej temperatury

Doświadczenia nad wpływem niskiej temperatury zostały przeprowadzone z braku odpowiednich urządzeń w sposób dość prymitywny. Ponieważ wielu autorów stwierdziło dodatni wpływ niskiej temperatury (niska temperatura w nocy w połączeniu z intensywnym oświetleniem we dzień) na tworzenie się w roślinach antocjanu, przeto w celu sprawdzenia tych spostrzeżeń dla tkanki *Vitis vinifera* wstawiano jej hodowle co 3-ą noc do lodówki o temp. $+4^{\circ}\text{C}$. Tkanki hodowane stale w temp. normalnej ($+20^{\circ}\text{C}$) służyły za kontrolę.

Dane zawarte w tabelce (tabela 14) wskazują, że w warunkach niniejszego doświadczenia niska temperatura nie posiada wpływu na syntezę antocjanu.

TABELA 14 — TABLE 14

Środowisko (medium)		Tkanka (tissue)			
sacharoza % (sucr. %)	temperatura (temperature) °C	wzrost mg/kult. (growth mg/cult.)	sucha masa % (dry weight %)	antocjan µg/g św. m. (anthocyan. µg/g fr. w.)	cukier mg/g św. m. (sugar mg/g fr. w.)
9	20°	339	22,1	405	60
	4° i 20° 12 h/72 h	359	21,3	444	65

VI. W p ł y w a z o t u

Doświadczenia nad wpływem azotu zostały niestety przeprowadzone w okresie niekorzystnym dla rozwoju tkanki, mianowicie w czasie 15.6.—27.7. Dla pracy wynikła stąd wielka szkoda, gdyż właśnie to zagadnienie dałoby się w dużej mierze wyświetlić przy pomocy metody hodowli tkanek. Wpływ azotu, niewątpliwie pośredni i wiązany dotychczas z przemianą cukrowcową w roślinie (C z a r t k o w s k i A. 1914, G a s s n e r G. i S t r a i b W. 1937) musi zostać zbadany w warunkach stałych ilości cukrów w środowisku i tkankach. Tę możliwość daje bezbarwna tkanka roślinna hodowana in vitro.

Brak azotu w pożywce uzyskano przez częściowe lub zupełne zastąpienie w roztworze Knopa $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ — przy pomocy CaCl_2 , a KNO_3 — przy pomocy KCl . Nadmiar azotu uzyskano przez dodatek do pożywki NaNO_3 .

TABELA 15 — TABLE 15

Pożywka (medium)		Tkanka (tissue)			
sach., % (sucr., %)	N_2O_5 M/l	wzrost mg/ kult. (growth mg/cult.)	sucha masa, % (dry weight %)	antocjan µg/g św. m. (anthocyanin µg/g fr. w.)	cukier mg/g św. m. (su- gar mg/g fr. w.)
6	0,0000	309	12,9	421	4,3
	0,0018	370	15,6	263	4,5
	0,0037	330	15,6	291	4,2
9	0,0037	273	21,0	400	6,4
	0,0055	369	22,6	437	7,4
	0,0073	364	20,0	260	4,8

Wyniki doświadczenia (tabela 15), aczkolwiek niezbyt kontrastowe i regularne, pozostają w zgodzie z obserwacjami innych autorów: brak azotu wpływa korzystnie, a jego nadmiar niekorzystnie na syntezę antocjanu. Związek tego zjawiska z ilością cukru w tkance nie został potwierdzony przez wyniki analiz. Natomiast wydaje się, że wzrost ilości azotu w pożywce wpływa korzystnie na wzrost tkanki.

VII. Wpływ pory roku

O wpływie pory roku na wzrost i produkcję antocjanu w tkance była już mowa w rozdziale „Materiał“. Dla zilustrowania tego wpływu posłuży zestawienie wyników dwóch identycznych doświadczeń przeprowadzonych w różnych miesiącach (jedno marzec—kwiecień, drugie — czerwiec—lipiec) (tabela 16).

TABELA 16—TABLE 16

sach. % w poż. (sucr. % in med)	czas (time)	wzrost mg/ kult. (growth mg/cult.)	suchz masa, % (dry weight, %)	antecjan µg/g św. m. (antho- cyanin µg/g fr. w.)	cukier mg/g św. m. (su- gar mg/g fr. w.)
6	21.III.	690	13,5	44	40
9		481	19,1	277	68
12	2.V.	374,	25,0	480	81
6	15.VI.	330	15,6	291	41
9		280	16,3	296	49
12	27.VII.	228	17,4	447	55

W okresie wiosennym tkanka odznacza się lepszym wzrostem, wyższym % suchej masy i wyższą ilością cukrów rozpuszczalnych w tkance, aniżeli w okresie letnim. Ilość produkowanego antocjanu jest mniej więcej taka sama. Natomiast pod każdym względem tkanka wiosenna jest czulsza na zmiany środowiska i odpowiada na nie większymi różnicami we wzroście, % suchej masy, ilości cukrów i antocjanu.

Produkcja antocjanu a wzrost tkanki

Przy rozpatrywaniu wpływu różnych czynników na produkcję antocjanu uderza jedno stale się powtarzające zjawisko: że wzmożona synteza antocjanu idzie zawsze w parze z zahamowaniem wzrostu tkanki (ilości produkowanej świeżej masy).

Jeszcze jedno przypadkowe lecz bardzo ciekawe spostrzeżenie można tutaj dorzucić. Przy okazji doświadczeń nad wpływem cukru chciano także zbadać wpływ maltozy, której brak usiłowano zastąpić diastazowym hydrolizatem skrobi. Zwykłą handlową mączkę ziemniaczaną podano hydrolizie przy pomocy diastazy, następnie hydrolizat zagęszczono przez odparowanie i w końcu oznaczono w nim metodą Bertranda ilość maltozy. Wzrost tkanki na hydrolizacie był nadzwyczajny. Jest on przedstawiony i porównany ze

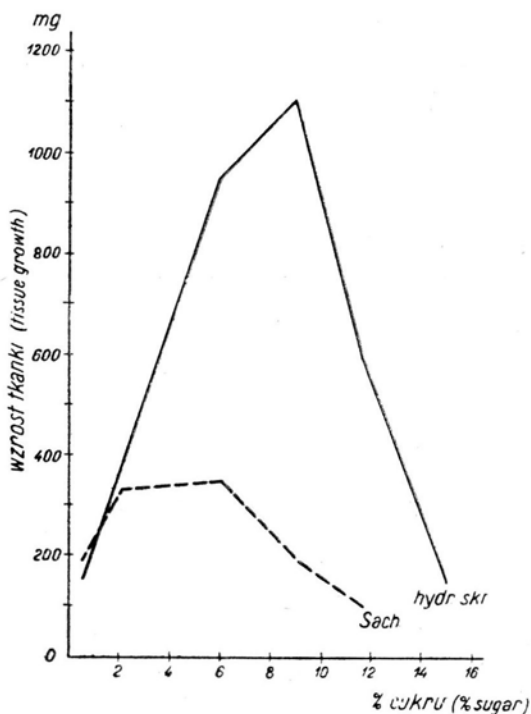


Fig. 10.

wzrostem na sacharozie na wykresie (fig. 10). Co jest jednak ciekawsze, w tkankach na hydrolizacie skrobiowym, niezależnie od jego stężenia, nie było nawet śladu antocjanu, podczas gdy na sacharozie antocjan pojawiał się normalnie! Trudno powiedzieć, co było powodem takiego zachowania się tkanki na hydrolizacie, jakie substancje były za nie odpowiedzialne. Nie są nimi w każdym razie substancje wzrostowe, o czym świadczy ostatnia praca Cz os n o w s k i e g o (1952 B) nad wpływem witamin na kilka tkanek m.in. *Vitis vinifera*. Silny wzrost na hydrolizacie jest z pewnością spowodowany obecnością w nim jakichś korzystnych sub-

stancji plastycznych, a brak antocjanu — być może — że dużą ilością fosforu, co do którego istnieją dane, że wpływa — podobnie jak azot — ujemnie na produkcję antocjanu (Reinhold J. i Kochs 1935) oraz zmniejszoną ilością cukrów w tkance, co wykazały analizy (tabela 17).

TABELA 17 — TABLE 17

Pożywka (medium)		Tkanka (tissue)
cukier (sugar)	stęż., ‰ (conc., ‰)	cukier, mg/g s. m. (sugar, mg/g dry weight)
sacharoza (sucrose)	0,5	5
	2	12
	6	31
	9	27
	12	31
Hydrolizat skrobi (starch hydrolyzate)	0,5	6
	2	6
	6	10
	9	16
	12	11
	15	13

Jeszcze jedno dodatkowe spostrzeżenie należy tu dodać: ilość cukru przypadająca na gram suchej masy wzrasta do chwili, gdy stężenie cukru w pożywce osiągnie poziom optymalny dla wzrostu tkanki. Począwszy od tego punktu, ilość cukru odniesiona do suchej masy nie zmienia się w przypadku sacharozy (por. „Wpływ cukrów“ p. C), a nieznacznie maleje w przypadku hydrolizatu skrobi.

D y s k u s j a

Przedstawione w pracy wyniki nie stoją na ogół w sprzeczności z badaniami innych autorów lat ostatnich. Odnosi się to w szczególności do niedawnej pracy Frey - W y s s l i n g a i B l a n k a (1943). Autorzy ci stwierdzili ogólną proporcjonalność między antocjanem a zawartością cukrów rozpuszczalnych w roślinie, jednak bez stałego stosunku między antocjanem a cukrem (stos. ant.: cukier). Wypowiadają oni pogląd, że jeżeli w ogóle istnieje jakiś związek między cukrami a antocjanami, to tylko tak pośredni, jak np. sztuczny dodatek cukru — wzmożona przemiana materii — wzmożona

produkcja antocjanu. W tkance winorośli synteza antocjanu zaczyna się, gdy stężenie cukru w tkance osiągnie pewne minimum, i wówczas stosunek „antocjan : cukier“ jest niezwykle mały. Później rapidly wzrasta, a dalej staje się dość nieregularny, choć z grubsza możnaby powiedzieć, że w dalszym ciągu następuje jego stopniowy wzrost. Jednak nawet dla jednakowych ilości cukru w tkance stosunek „antocjan : cukier“ w różnych kulturach nie jest stały i wykazuje dość duże różnice. Zjawisko to jest jeszcze znacznie bardziej uderzające w przypadku, gdy inny czynnik, nie cukier, wzmacnia syntezę antocjanu. Wówczas stosunek „antocjan : cukier“ tak wzrasta, że w żadnym razie wpływ tego czynnika nie idzie poprzez akumulację cukru w tkance. Najciekawszym z tych czynników jest ciśnienie osmotyczne. E. O v e r t o n (1899), gdy wykonywał swe klasyczne doświadczenia nad wpływem cukrów, nie omieszkał dla kontroli zbadać wpływu roztworów NaCl, NaNO₃, K₂SO₄ i in. o izotonicznym ciśnieniu z roztworami cukrów. Otrzymał z nimi wynik negatywny. Dla wywołania antocjanu w roślinach O v e r t o n używał roztworów cukrów 2—5⁰/. Ilość ta wystarczała dla zapewnienia supra-optimalnego stężenia cukru w zielonej tkance asymilującej rośliny. Natomiast nie wiadomo, czy izotoniczne z roztworem cukru stężenie soli mineralnych wystarczało, by spowodować pojawienie się antocjanu. Z drugiej strony silne stężenia soli działają na tkankę toksycznie. Dla sprawdzenia należałoby powtórzyć doświadczenia O v e r t o n a w sposób podobny do doświadczeń z tkanką *Vitis vinifera*, dając stężenie cukru znajdujące się tuż przed progiem wywołującym pojawienie się antocjanu i dodając następnie soli mineralnych do roztworu.

Z obserwacji w naturze znane są fakty, że susza wzmacnia ilość antocjanu w roślinie (G e r t z O. 1907, Z a n k e r J. 1930). Tłumaczono te fakty w sposób czysto spekulatywny, że brak soli mineralnych osłabia syntezę białek, co z kolei powoduje gromadzenie się cukrów i wzmoczoną syntezę antocjanu. Ilościowe badania zawarte w niniejszej pracy wykazują jednak, że wysokie ciśnienie osmotyczne nie wzmacnia akumulacji cukrów w tkance, a nadmiar azotu nie osłabia jej, jakkolwiek obydwie te czynniki wpływają na ilość antocjanu.

Niestety, fakty te nie tylko nie pozwalają na lepsze wytłumaczenie mechanizmu działania różnych czynników na proces powstawania antocjanu, ale sprawę komplikują jeszcze bardziej.

Uzyskane w pracy niniejszej wyniki pozwalają jedynie na sformułowanie zupełnie ogólnych wniosków. Stosunkowo wysoka

koncentracja cukrów rozpuszczalnych w tkance wydaje się być warunkiem sine qua non syntezy antocjanu. Może to być związane ze stosunkowo małą aktywnością powierzchni jednego z enzymów syntezy antocjanu i potrzebą dużej koncentracji cukru, by zaczęła ona działać. Po uzyskaniu przez cukier pewnego progowego poziomu koncentracji, synteza antocjanu może być wywołana lub wzmożona także przez inne czynniki, np. czynniki zewnętrzne natury fizykalnej. Wiadomo, że fizykalna organizacja plazmy kieruje metabolizmem i przy tej samej ilości substratu przebieg reakcji może wykazywać różnice ilościowe i jakościowe. Po tej drodze mógłby działać czynnik ciśnienia osmotycznego. Podobnie ogólne zjawisko powiązania produkcji antocjanu z osłabieniem wzrostu tkanki możnaby wytłumaczyć znanym faktem, że nienormalne, niekorzystne warunki mogą hamować lub sprzyjać działalności jakiegoś enzymu wzgl. systemu enzymatycznego i w ten sposób skierowywać łańcuch przemian w komórce na nową drogę.

Problem biogenezy antocjanu wymaga dokładnych fizjologiczno-chemicznych badań, które pozwolą prześledzić ten proces od cząsteczki barwika do cząsteczki cukru, od którego wszystko się w roślinie zaczyna. Początek takim badaniom dała ostatnia praca Y. H. Edmondsona i K. V. Thimanna (1950) nad rolą miedzi w biosyntezie antocjanu. Jednorodna, bezbarwna tkanka *Vitis vinifera*, dla której zostały poznane warunki powstawania antocjanowego barwika, może odegrać w podobnych badaniach doniosłą rolę.

Jeden fakt został już przy jej pomocy w prosty sposób stwierdzony: Do ostatnich czasów nie można było rozstrzygnąć (Thimann K. V. i Edmondson Y. H. 1949), czy proces syntezy antocjanu jest sam reakcją fotochemiczną, czy też zależy od światła poprzez zapotrzebowanie na produkty fotosyntezy. Wybitna zależność produkcji antocjanu od światła w bezbarwnej tkance wykazuje, że zachodzi tu pierwsza z możliwości: w procesie biogenezy antocjanu znajduje się reakcja fotochemiczna.

Pracę niniejszą wykonałam w Zakładzie Botaniki Ogólnej Uniwersytetu Poznańskiego. Panu prof. dr F. Górskiemu, kierownikowi Zakładu Fizjologii Roślin U. J., oraz panu dr J. Czosnowskiemu, kierownikowi Zakładu Botaniki Ogólnej U. P., pragnę wyrazić wdzięczność za wielką życzliwość i cenne wskazówki w trakcie wykonywania pracy.

S U M M A R Y

1. Introduction. The physiology of anthocyanin pigments have been subjected to very numerous investigations, nevertheless, both the biogenesis and the role these substances play in the metabolism and life of plants remain unknown. This paper represents an essay for using the method of plant tissue culture for experiments on the biogenesis of anthocyanins. A vine shoot tissue cultivated in vitro possesses a peculiar quality: it contains no chlorophyll and in some conditions it forms anthocyanin pigments in large quantities. Moreover, the plant tissues cultivated in vitro represent an isolated, morphologically and physiologically homogenous forme. For this reason they have proved suitable for several physiological investigations. The knowledge of the conditions in which the anthocyanin formation occurs in an isolated and colourless plant tissue, will form a basis for detailed investigations which, may be, will contribute to the solution of the problem of the biogenesis of this pigment.

2. Material. The „healthy“ (C z o s n o w s k i J. 1952 A) tissue of *Vitis vinifera*, used as experimental material for this work, has been isolated by G. Morel in 1944 in Paris. It appears as a white, compact, shapeless mass with a rough and protuberant surface. The anthocyanin pigment in *Vitis vinifera* is oenin (Willstaetter R. and Zollinger E. H. 1915) — a dimethyl-delphinidin-3-monoglucoside (Robinson R. 1935). For the identification of the anthocyanin pigment in the cultivated tissue its absorption spectrum was compared with the absorption spectrum of oenin chloride, prepared from grapes by the method applied by Willstaetter and Zollinger (1915). Oenin chloride diluted in methyl alcohol with HCl was used for measurements. The tissue pigment was also extracted with methyl alcohol + HCl. pH of both solutions was 2,2. The absorption spectrum is determined with a Coleman Junior photoelectric spectrophotometer. The absorption spectra of two pigments are not identical (fig. 1). The optical density curve for tissue pigment in comparison with oenin chloride has its peak shifted 15m μ towards the blue end of the spectrum. This fact indicates either that it has a different molecular structure or that the extract contains some co-pigments which alter its absorption spectrum (see G. M. Robinson and R. Robinson, Biochem. J. 1931, 25, 1687). The high absorption in the near ultraviolet is probably due to accompanying flavone pigments in the extract (see Thimann K. V. and Edmondson Y. H. 1949).

3. Methods. The composition of the basic medium on which the tissue cultures were kept is given in p. 544 and 545. In the experiments this basic medium was modified.

The amount of anthocyanin was determined colourimetrically with a photoelectric colourimeter (Lange). In spite of differences in the absorption spectra of oenin and tissue anthocyanin, the amount of tissue pigment was expressed as mg oenin. The differences of both spectra are small and probably due to some co-pigment contents in the extract. The resulting experimental error is also small and the same in all experiments. The tissue pigment was extracted as follows: the tissue was immersed in methyl alcohol with HCl (5 : 1), crushed in a mortar and centrifuged. The clear extract was determined by colourimeter. The pH of the extract was then measured with a ionometer. The use of buffers for extracting the pigment was impossible because of its discolouration in contact with each applied buffer. Likewise oenin chloride dissolves in none of the buffers used, although in distilled water it dissolves very well. pH of anthocyanin extracts oscillated between 1,8 to 2,7. Since the light absorption of anthocyanins strongly depends upon pH (fig. 2) (cf S o n d h e i m e r E. and K e r t e s z Z. I. 1948) — a series of oenin solutions of different concentrations and different pH are made and their light absorption in Lange colourimeter is determined (fig. 3). From the results thus obtained a series of absorption curves is made for pH 1,8 to 2,7, every 0,2 unit being the analytical point. The amount of extracting pigment is read from these diagrams and then expressed in mg oenin/1 g of fresh weight of the tissue. The sugar amounts in the tissue are determined by the Hagedorn-Jensen method. The soluble polysaccharides — before being determined — are hydrolysed with HCl (0,5 ml HCl conc. are added to 5 ml of the extract and heated in a water-bath at 70°C temp. for 8 min.) and then neutralized with NaOH.

4. The effect of sugars. The sugar amounts in the medium were chosen so, that at their lowest concentration the anthocyanin production did not or almost not occur and at the highest concentration the tissue was not killed.

With increasing sugar concentrations in the medium (beginning with optimal concentration for growth which is here the lowest concentration applied) the fresh weight production (growth/cult.) decreases. This fact is connected with a decreasing water content of the tissue (probably owing to the increasing osmotic pressure of the medium) because simultaneously the dry weight percent of the tissue

increases considerably and the dry weight production remains nearly constant (table No. 1).

The anthocyanin content of the tissue increases with the increasing sugar concentrations of the medium. This fact partially connected with the „condensing“ of the tissue (decreasing water content) — see fig. 4 — the curve „anthocyanin concentration (anth./g fr. w.) by growth“ falls more rapidly than the curve „anthocyanin production (anth./cult.) by growth“. But the second and fundamental cause is here the production of anthocyanin, for the amount of anthocyanin increases not only by a unit of fresh weight of the tissue, but also by a unit of dry weight of the tissue (while the dry weight production is independent of sugar concentration — table No. 1) and by culture (table No. 2). The sugar accumulation in the tissue increases with the increasing sugar concentration in the medium. The absorption of sugar is proportional to its concentration in the medium. Therefore, due to the doubleness of sucrose molecule, the same percent concentrations of sucrose and (glucose + fructose) give the same sugar accumulation in the tissue and the same molar concentrations in the case of sucrose result in a sugar accumulation twice as large as in the case of glucose + fructose (within the error of the method). The sugar percent in the dry matter of the tissue is nearly constant and independent of sugar concentration in the medium (all the sugar concentrations applied were optimal to supra-optimal for growth) (table No. 3).

The amount of anthocyanin as well as the amount of soluble sugars in the fresh weight of the tissue increase together with the increasing sugar concentration of the medium. This fact seems at first to confirm O v e r t o n ' s theory (1899) of a direct and strict connection between the sugar content and the anthocyanin content of the tissue. Nevertheless, when analysing the experimental data in details, such interpretation appears to be wrong.

I. Even calculated on the fresh weight of the tissue — the ratio „anthocyanin : sugar“ is not constant and regular: In general — with the increasing sugar concentrations in the tissue — it gradually diminishes (table No. 4) and very often its values show high differences for \pm the same sugar concentrations in the tissue.

II. While the amounts of anthocyanin increase in the dry matter of the tissue, the amounts of sugars remain nearly constant (table No. 5).

III. An interesting problem represent the differences between sucrose and glucose + fructose. Even a different sugar accumula-

tion in the tissue is not completely responsible for different anthocyanin formation in the tissues cultivated on these sugars. Diagram in fig. No. 5 illustrates this fact. The same amounts of sugars in the tissue cultivated on sucrose correspond to smaller anthocyanin quantities than in the tissue cultivated on glucose + fructose. The difference between a disaccharide sucrose and monosaccharides glucose and fructose is the doubleness of sucrose molecule and accordingly a lower osmotic pressure in a solution. The second diagram (fig. No. 6) shows the data of anthocyanin formation in relation to osmotic pressure of the medium. The relations are here reverted to those presented in the former diagram (No. 5): the same osmotic pressure produces a more favourable effect on anthocyanin formation when exerted by sucrose than by glucose with fructose.

The tissues which are cultivated on diverse sugars show also differences in the water content (cf table No. 1) and the soluble sugars and anthocyanin are dissolved in vacuolar sap. For that reason the sugar and anthocyanin amounts were also related to the water content of the tissue which is nearly equal to relating these substances to vacuolar sap (table No. 6). The diagrams illustrating the data obtained (fig. 7—8) are very similar to the former (fig. 5—6). Therefore, the influence exerted by increasing sugar concentrations on the anthocyanin synthesis seems to consist in two factors: in increased osmotic pressure exerted on the tissue by the medium and in high amounts of soluble sugars accumulating in the tissue.

5. The effect of osmotic pressure. In experiments on the influence of osmotic pressure of the medium the value of osmotic pressure is altered by the addition of NaCl.

NaCl. in conc. 0,05 M promotes strongly the anthocyanin production (table No. 8). In conc. 0,10 M the anthocyanin amount decreases again, but this decrease is very probably due to a toxic effect of an excess of NaCl. Very interesting is a comparison of the effect of sucrose with that of sucrose + NaCl added in respect of the osmotic pressure (fig. No. 9). The curves „anthocyanin amounts by osmotic pressure“ from O to NaCl 0,05 run almost together. The subsequent decrease of sucrose + NaCl. curve can be explained by an injurious effect of an excess of NaCl. The analyses showed that increased anthocyanin formations do not correspond here with increased sugar accumulations in the tissue (table No. 9). Consequently, the promoting effect of the osmotic pressure on anthocyanin formation is not connected with a sugar accumulation in the tissue.

Likewise it is probably not connected with a difficulty of water absorption by tissue. This is showed by experiments on the effect of the amounts of available water. In these experiments the amount of available water in the medium is altered by agar-agar added. In increasing agar concentrations the amounts of anthocyanin and sugar remain at first nearly constant and in the highest concentration of agar (3%) they rather diminish (table No. 10). In experimental conditions mentioned above the amount of available water has no effect on anthocyanin formation.

6. The effect of light. The cultures „in light“ were grown in full daylight and those „in darkness“ covered with a black paper cap. The light has a distinct promoting influence on the anthocyanin synthesis (table No. 12). The amounts of sugars also slightly increase in light, but the differences are too small to be held responsible for the increased anthocyanin synthesis. This is demonstrated by the ratio „anthocyanin : sugar“ which is considerably lower in darkness than in light. Among the reactions leading to anthocyanin synthesis a photochemical reaction is undoubtedly present.

7. The effect of low temperature. The experimental cultures are placed every third night (12h/72h) in a refrigerator at temp. 4°C. In these conditions the low temperature has no effect on the formation of anthocyanin (table No. 14).

8. The effect of nitrogen. The amount of nitrogen in the medium is altered by substituting CaCl_2 and KCl for $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and KNO_3 of Knop solution and by adding NaNO_3 to the medium. Unfortunately, these experiments are performed in a season unfavourable for the development of the tissue (see: The influence of season). Nevertheless, the experimental results, although not very regular and contrasting, confirm the observations of other authors: a lack of nitrogen is favourable and its excess has an unfavourable effect on the formation of anthocyanin (table No. 15). A connection of this fact with the amount of sugar accumulated in the tissue has not been stated (table No. 15).

9. The influence of season. In spring the rate of growth, of dry weight percent and of sugar accumulation is higher than in summer. The amounts of anthocyanin produced are nearly the same. But in every respect the spring tissue is more sensitive to changes in the environmental conditions and reacts to them with higher differences in growth, dry weight percent, sugar accumulation and anthocyanin formation (table No. 16).

10. Anthocyanin formation and the growth of the tissue. An increased anthocyanin formation is always connected with a decreased growth rate. A good example of this fact can be given by an occasional experiment on the influence of an enzymic (diastaze) starch hydrolizate. On the hydrolizate the growth of the tissue was excellent (fig. 10), but, irrespective of concentration used, the tissues showed no traces of anthocyanin pigments. The excellent growth is most probably brought about by the presence of very suitable plastic substances in the starch hydrolizate, for diverse additional growth substances (vitamins) have no effect on growth of *Vitis vinifera* (C z o s n o w s k i J. 1952 B). The lack of anthocyanin, at least in part, is possibly caused by a diminished sugar content in the vacuolar sap, which is shown by analyses (table No. 17).

11. General conclusions. A relatively high concentration of soluble sugars seems to be a condition sine qua non of anthocyanin synthesis. When a minimal value of sugar concentration is reached, the anthocyanin synthesis can also be produced or increased by other factors, such as external physical conditions. It is known, that a physical organization of protoplasts governs the metabolism and by identical substrate concentrations qualitative as well as quantitative differences may appear in the results of diverse enzymic reactions. In this manner the efficiency of the osmotic pressure factor could be explained. Likewise could be explained the general connection of anthocyanin production with a decrease of growth rate, for it is a known fact that abnormal environmental conditions can result in an inhibition or stimulation of any enzyme or enzyme system and in this manner direct the reaction chains in the cell in new direction. In the problem of anthocyanin biogenesis further physiological and biochemical investigations are necessary for following this process from pigment molecule to molecule of sugar. In such studies the tissue culture method may be of high importance. So far it has allowed us to decide one question: as yet it was undecided whether the process of anthocyanin synthesis is by itself a photochemical reaction or it depends indirectly upon light through a demand on products of photosynthesis. The anthocyanin synthesis in a colourless plant tissue depends distinctly upon light and this fact indicates that a photochemical reaction is undoubtedly present in the process of anthocyanin biogenesis.

CYTOWANA LITERATURA

(Literature cited)

1. C o m b e s R. 1909. Recherches biochimiques su le développement de l'anthocyane chez les végétaux. C. R. Ac. Sc. Paris 148, 790—792.
2. C o m b e s R. 1911. Recherches sur la formation des pigments anthocyaniques. Ibidem, 153, 886—888.
3. C z a r t k o w s k i A. 1914. Anthocyanbildung und Aschenbestandteile. Ber. d. d. bot. Ges., 32, 407—410.
4. C z o s n o w s k i J. 1952. A. Charakterystyka fizjologiczna trzech typów tkanek *Vitis vinifera*: normalnej, tumora bakteryjnego (crown-gall) i tumora chemicznego hodowanych in vitro. (Physiological features of three types of tissue of *Vitis vinifera*: healthy, crown-gall and chemical tumor, cultivated in vitro). Prace Kom. Biol. Pozn. Tow. Przyj. Nauk. XII, p. 189.
5. C z o s n o w s k i J. 1952. B. Badania nad gospodarką witaminową tkanek roślinnych hodowanych in vitro na tle ich gospodarki substancjami wzrostowymi typu auksyny. (Studies on the vitamin metabolism of plant tissues cultured in vitro on the basis of their activity regarding growth substances of the auxin type.) Ibidem. XIII, p. 209.
6. E d m o n d s o n Y. H. and T h i m a n n K. V. 1950. The biogenesis of the anthocyanins. II. Evidence for the mediation of copper in anthocyanin synthesis. Arch. Biochem. 25, 79—90.
7. F l o r e n G. 1941. Untersuchungen über Blütenfarbmuster und Blütenfärbungen. Flora, N. F. 35, 65—100.
8. F r e y - W y s s l i n g A. und B l a n k F. 1943. Untersuchungen über die Physiologie des Anthocyanins in Keimlingen von *Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. f. *rubra* (L.). Ber. Schweiz. Bot. Ges. 503 A, 550—578.
9. G a s s n e r G. und S t r a i b W. 1930. Über die Anthocyanbildung junger Getreidepflanzen und ihre Verwertbarkeit als Sortenmerkmal. Wiss. Arch. Landw., A, 4, 169—195.
10. G a s s n e r G. 1937. Untersuchung über den Einfluss der Mineral-salzernährung auf die Anthocyanbildung an junger Gerstenpflanzen. Angew. Bot. 19, 225—245.
11. G a u t h e r e t R. J. 1947. Plant tissue culture. Sixth Growth Symposium, 21—43.
12. G a u t h e r e t R. J. 1948. La culture des tissus végétaux. Endeavour, vol. VII, No 26.
13. G e r t z O. 1907. Studier ofver anthocyan. Bot. Centralbl., 105, 347—349.
14. H a r d e r R. 1938. Über Farb- und Musteränderungen bei Blüten. Naturw. 26, 713—722.
15. J o n e s c o St. 1921. Formation de l'anthocyane dans les fleurs de *Cobaea scandens* au dépens des glucosides préexistants. C. R. Ac. Sc. Paris, 173, 850—852.
16. J o n e s c o St. 1922. Recherches sur le rôle physiologique des anthocyanes. Ann. Sc. Nat., Bot. 10-me ser. 4, 301—403.
17. K o z ł o w s k i A. 1935. Powstawanie w roślinach antocjanu przez utlenianie antocjanogenów. Acta Soc. Bot. Pol., XII, 275—288.
18. K o z ł o w s k i A. 1937. Antocjanogen liści karłowatego, kędzierzawego jarmużu zielonego. Ibidem XIV, 283—287.

19. L e h m a n n O. 1931. Die quantitative Erfassung kleinster Mengen biologisch wichtiger Zuckerarten unter Ausschluss reduzierender nicht kohlehydratartiger Körper. *Planta*, 13, 575—642.
20. M o l l i a r d M. 1909. Production expérimentale de tubercules blanc et de tubercules noirs a partir de graines de radis rose. *C. R. Ac. Sc. Paris*, 148, 573—575.
21. M o l i s c h H. 1918. Pflanzenphysiologie als Theorie der Gärtnerei. 2. Aufl. Jena. Str. 324 (p. 84—86: Über auffallende Steigerung der Anthocyanbildung).
22. M o l i s c h H. 1928. Rote Wurzelspitzen. *Ber. d. d. bot. Ges.*, 46, 311—317.
23. M o r e l G. 1948. Recherches sur la culture associée de parasites obligatoires et de tissus végétaux. *Ann. Epiph. N. S. XIV. Ser. Path. Veg.*, Mem. no. 5, p. 112.
24. N o a c k K. 1922. Physiologische Untersuchungen an Flavonolen und Anthocyanen. *Zeitschr. f. Bot.* 14, 1—74.
25. O v e r t o n E. 1899. Beobachtungen und Versuche über das Auftreten von rotem Zellsaft bei Pflanzen. *Jahrb. wiss. Bot.*, 33, 171—231.
26. R e i n h o l d J. und K o c h s. 1935. Der Einfluss der Düngung auf Ertrag und Qualität des Kohles. *Zeitschr. Pfl.-Ern., Düng. u. Bdkde*, 39, 198—211.
27. R o b i n s o n R. 1935. Chemistry of the anthocyanins. *Nature*, 135, 732—736.
28. S k a z k i n F. D., Ł o w e z i n o w s k a j a E. J., K r a s n o s j e l s k a j a T. A. 1948. Praktikum po fizjologii rastienii. Moskwa. Sowjetskaja Nauka. p. 377.
29. S o n d h e i m e r E. and K e r t e s z Z. I. 1948. Anthocyanin pigments. Colorimetric determination in strawberries and strawberry products. *Anal. Chem.* 20, 245—248.
30. T h i m a n n K. V. and E d m o n d s o n Y. H. 1949. The biogenesis of the anthocyanins. I. General nutritional conditions leading to anthocyanin formation. *Arch. Biochem.*, 22, 33—53.
31. W i l l s t ä t t e r R. und Z o l l i n g e r E. H. 1915. Über die Farbstoffe der Weintraube und der Heidelbeere. *Liebigs Ann.*, 408, 83—109.
32. Z a n k e r J. 1930. Untersuchungen über Geraniaceen. *Planta*, 9, 681—717.