ACTA AGROBOTANICA
Vol. XXVII, z. 1, 1974

# Zmiany w składzie chemicznym ściany komórkowej źdźbła pszenicy traktowanej chlorkiem chlorocholiny (CCC).

**MARIA PRZESZLAKOWSKA**

Instytut Chemii i Technologii Rolnej, Zakład Biochemii
Akademia Rolnicza, Lublin

(Przyjęto dn. 15.8.1973 r.)

M. Przeszlakowska. (Institute of Chemistry and Agricultural Technology, Department of Biochemistry, Agricultural Academy, Lublin, Poland) *Acta Agrobotanica 27 (1): 19-28, 1974.*

*Changes in the cell walls of wheat culms treated with 2-chloroethyl-trimethyl-ammonium chloride (CCC).*

The influence of 2-chloroethyl-trimethyl-ammonium chloride (CCC) on the content of various constituents of the cell wall of the wheat culms var. Eka Nowa) was investigated. Chromatographic analysis of the polysaccharides obtained from the cell wall of the wheat culms has been carried out. The content of pectic substances (pectins and protopectins) in nodes and internodes of the wheat culms treated with CCC was determined.

## WSTĘP

Zjawisko odporności u roślin pozostaje w ścisłym związku z budową i składem chemicznym ścian komórkowych oraz protoplazmy (Albersheim i wsp. 1969; Rubin i Arcichowska 1971). Liczne dane literaturowe wskazują na to, że stosunek ilościowy poszczególnych składników, rodzaje wiązań chemicznych występujących między nimi oraz procesy biochemiczne zachodzące w ścianach komórek roślinnych mają duże znaczenie w mechanizmie odporności, a szczególnie odporności na choroby (Wood 1960; Bateman 1966; Blaim 1968).

Budowa i skład chemiczny ściany komórkowej ulega istotnym zmianom podczas wzrostu i rozwoju roośliny; znaczne różnice występują również w budowie ścian komórkowych pomiędzy odmianami tego samego gatunku (Nevins i wsp. 1968). Stosunek ilościowy poszczególnych składników zmienia się pod wpływem nawożenia mineralnego, stosowanych coraz częściej regulatorów wzrostu roślin oraz innego typu związków chemicznych (Northcote 1958; Knypl 1971).

Jednym z najbardziej interesujących objawów działania chlorku chlorocholiny (CCC, antywylegacz) jest wzrost odporności pszenicy na wyleganie (Listowski i Żebrowski 1967; Góra 1967), suszę (Plant i Halevy 1966; Listowski i Żebrowski 1967; Uskow i Pjatig in 1969); a także niektóre choroby i szkodniki (Góra 1967).

Celem pracy było zbadanie wpływu chlorku chlorocholiny (CCC) na skład chemiczny ścian komórkowych źdźbła pszenicy. Obiektem badań była pszenica 'Eka Nowa'. Odmiana ta jest bardzo wrażliwa na działanie wspomnianego preparatu i reaguje dużym skróceniem źdźbła (średnio o 23%) oraz zwiększoną odpornością na niesprzyjające warunki środowiska (Listowski i Żebrowski 1967).

## MATERIAŁ I METODY BADAŃ

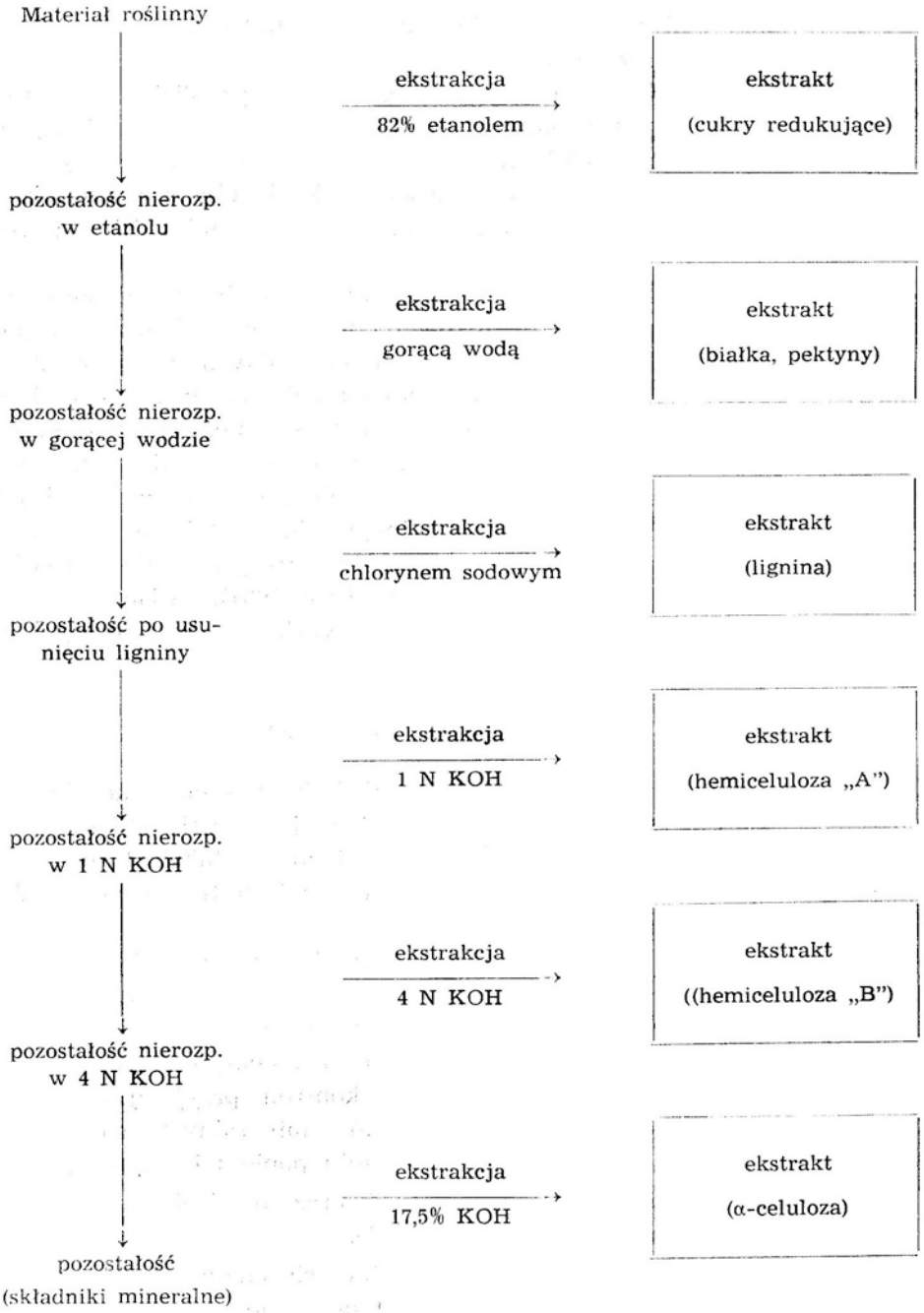
Materiał do badań stanowiły źdźbła pszenicy, odmiany 'Eka Nowa', zebrane w fazie kwitnienia (26 VI 1970 r.) metodą losową z poletek doświadczalnych IUNG w Puławach. Nawożenie mineralne było następujące: 80 kg N; 72 kg $P_2O_5$; 80 kg $K_2O$ na 1 ha. Oprysku chlorkiem chlorocholiny (CCC) dokonano w fazie strzelania roślin w źdźbło, w ilości 12 kg aktywnej substancji na hektar. Ścięte źdźbła pszenicy pozbawione kłosów i liści suszono w temp. 60°C, a następnie rozdrabniano w młynku.

W celu wyodrębnienia poszczególnych składników ścian komórkowych, materiał roślinny poddano frakcjonowaniu metodą Jermyna i Isherwooda (1956), z niewielkimi modyfikacjami. Tok postępowania przedstawia zamieszczony poniżej schemat:

We frakcji etanolowej oznaczono wolne cukry redukujące metodą Bertranda. Nierozpuszczalne w etanolu pozostałe składniki ściany komórkowej (pektyny, białka, holocelulozy oraz ligniny) ekstrahowano gorącą wodą w celu wyodrębnienia pektyn i białek. Ilościowe oznaczanie pektyn rozpuszczalnych i protopektyn dokonano metodą kolorymetryczną, opartą na barwnej reakcji tych połączeń z karbazolem (Blaim i Przeszlakowska 1968). Zawartość białka oznaczono kolorymetrycznie metodą Lowry'ego i wsp. (1951), wapń oznaczono manganometrycznie.

Z nierozpuszczalnej w wodzie pozostałości usuwano ligninę przez działanie chlorynem sodowym. Pozostałość po usunięciu ligniny, zawierającą holocelulozy (hemicelulozę „A", hemicelulozę „B", α-celulozę) frakcjonowano metodą Wise i wsp. (1946). Po usunięciu hemicelulozy „A" i hemicelulozy „B" pozostałość stanowiła α-celulozę (α-celulozą nazwano tę część celulozy, która nierozpuszcza się w 17,5% roztworze wodorotlenku potasowego w temp. pokojowej).

Badany materiał po kolejnych ekstrakcjach suszono i ważono, a z




Schemat frakcjonowania ścian komórkowych źdźbła pszenicy traktowanych chlorkiem chlorocholiny (CCC) oraz roślin kontrolnych (wg Jermyna i Isherwooda 1956).

ubytków masy obliczano zawartość danego składnika w przeliczeniu na suchą masę surowca wyjściowego.

Wyodrębnione składniki cukrowe poddano hydrolizie (Jermyn i Isherwood 1956), a następnie analizie chromatograficznej wg metody opisanej w poprzedniej pracy (Przeszlakowska 1973).

Frakcjonowanie i oznaczanie wszystkich składników przeprowadzono trzykrotnie dla pszenicy kontrolnej oraz traktowanej CCC wg tych samych metod.

Wyodrębnianie oraz ilościowe oznaczanie różnych frakcji substancji pektynowych występujących w węzłach i międzywęźlach pszenicy poddanej działaniu CCC oraz w roślinach kontrolnych przeprowadzono w trzech powtórzeniach, dla każdego powtórzenia dokonywano po 5 odczytów. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie, przeprowadzając najpierw analizę wariancji wg schematu kompletnej randomizacji (ulosowienia). W przypadku udowodnienia różnic pomiędzy efektami faktorialnymi czynników lub istotności interakcji, średnie porównywano przy pomocy najmniejszych istotnych różnic (półprzedziałów ufności), opartych na teście „t" Studenta (Oktaba 1966, 1967). Za istotne uznano te różnice, które można było udowodnić z ryzykiem błędu równym lub mniejszym niż 5%.

## WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Zmiany w ilościowej zawartości składników ściany komórkowej źdźbła pszenicy, odmiany 'Eka Nowa' poddanej działaniu chlorku chlorocholiny, oraz roślin kontrolnych zestawiono w tabeli 1, natomiast zmiany w zawartości popiołu i wapnia w źdźbłach traktowanych CCC są przedstawione w tabeli 2.

Z przedstawionych wartości (tab. 1) wynika, że chlorek chlorocholiny powoduje dość istotne zmiany w składzie chemicznym ścian komórkowych źdźbła pszenicy. Pod wpływem tego retardanta zwiększa się zawartość cukrów redukujących średnio o 30%, pektyn rozpuszczalnych o 70%, białka o 8% w odniesieniu do kontroli przyjętej jako 100%. Zwiększa się również zawartość składników mineralnych, co potwierdzone zostało także w ilościowym oznaczaniu popiołu i wapnia (tab. 2).

Zawartość ligniny, hemicelulozy „A" oraz hemicelulozy „B" nie ulega praktycznie żadnym zmianom (tab. 1).

Na podstawie przeprowadzonej analizy chromatograficznej polisacharydów ściany komórkowej źdźbła stwierdzono, że badane [illegible] mają budowę złożoną, a jakościowy ich skład nie ulega zmianom pod wpływem chlorku chlorocholiny (rys. 1 i 2).

Ze względu na istotne zwiększenie zawartości pektyn rozpuszczalnych w ścianie komórkowej źdźbła poddanego działaniu CCC, postano-

Tabela 1 — Table 1

Wpływ chlorku chlorocholiny (CCC) na zawartość poszczególnych składników ściany komórkowej źdźbła pszenicy

Influence of 2-chloroethyl-trimethyl-ammonium chloride (CCC) on the content of various constituents in the cell wall of the wheat culms

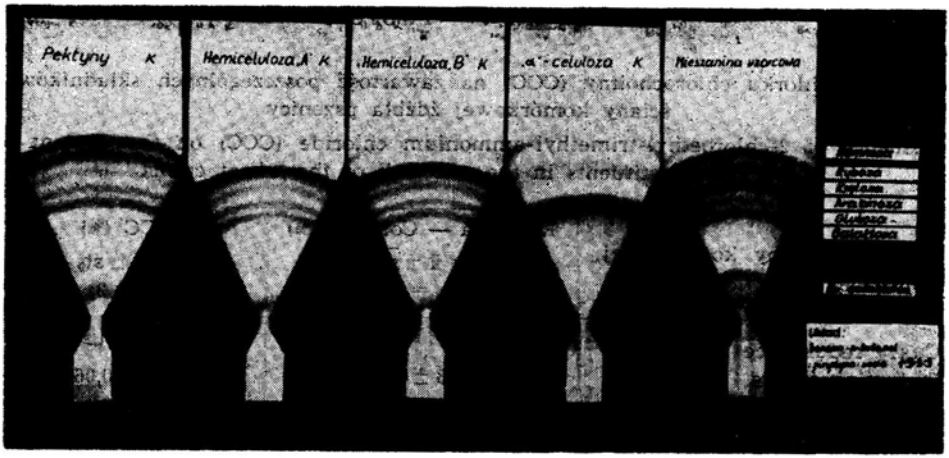
| Składniki ściany komórkowej<br>Constituents of the cell wall | Kontrola — Control (%)<br>$\mu = \bar{x} \pm \bar{s}t_{0,95}$<br>(n = 3) | CCC (%)<br>$\mu = \bar{x} \pm \bar{s}t_{0,95}$<br>(n = 3) |
|---|---|---|
| Cukry redukujące<br>Reducting sugars | 5,48 ± 0,23 | 7,20 ± 0,06 |
| Pektyny<br>Pectins | 0,27 ± 0,02 | 0,46 ± 0,02 |
| Białka<br>Proteins | 2,01 ± 0,05 | 2,18 ± 0,08 |
| Ligniny<br>Lignins | 9,54 ± 0,30 | 9,83 ± 0,25 |
| Hemiceluloza „A"<br>Hemicellulose "A" | 22,48 ± 0,43 | 22,55 ± 0,32 |
| Hemiceluloza „B"<br>Hemicellulose "B" | 6,84 ± 0,09 | 6,52 ± 0,18 |
| α-celuloza<br>α-cellulose | 34,47 ± 0,34 | 34,43 ± 0,22 |
| Pozostałość<br>(składniki mineralne)<br>Residue<br>(mineral substances) | 3,93 ± 0,06 | 4,12 ± 0,06 |

Tabela 2 — Table 2

Wpływ chlorku chlorocholiny na zawartość popiołu i wapnia w źdźbłach pszenicy

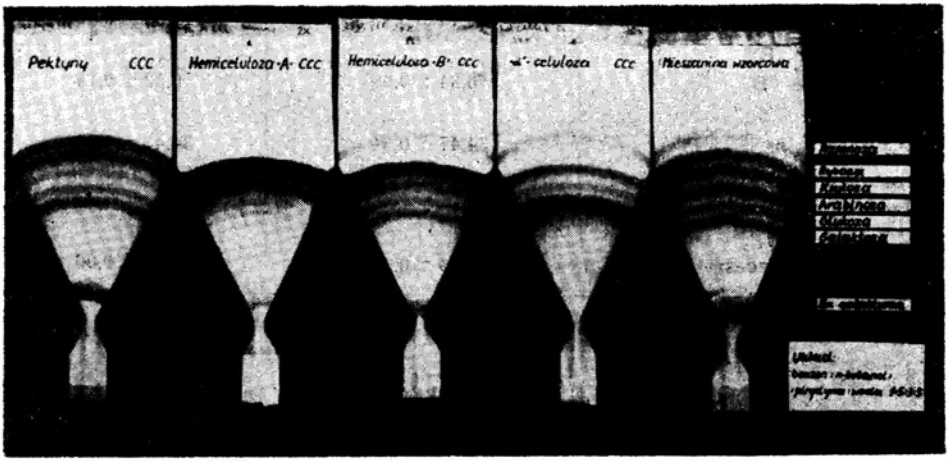
Influence of the CCC on the ash and calcium content in wheat culms

| Składniki<br>Constituents | Kontrola — Control (%)<br>$\mu = \bar{x} \pm \bar{s}t_{0,95}$<br>(n = 3) | CCC (%)<br>$\mu = \bar{x} \pm \bar{s}t_{0,95}$<br>(n = 3) |
|---|---|---|
| Popiół<br>Ash | 6,80 ± 0,31 | 8,72 ± 0,27 |
| Wapń<br>Calcium | 0,22 ± 0,02 | 0,33 ± 0,04 |




Rys. 1. Chromatogramy hydrolizatów polisacharadów ściany komórkowej źdźbła pszenicy 'Eka Nowa' (kontrola)

Fig. 1. Carbohydrate composition of polysaccharide fractions isolated from the cell wall of the wheat culms (control)




Rys. 2. Chromatogramy hydrolizatów polisacharydów ściany komórkowej źdźbła pszenicy traktowanej chlorkiem chlorocholiny

Fig. 2. Carbohydrate composition of polysaccharide fractions isolated from the cell wall of the wheat culms treated with CCC

wiono następnie zbadać wpływ tego preparatu na zawartość pektyn i protopektyn w węzłach i międzywęźlach pszenicy. Pektyny rozpuszczalne ekstrahowano wodą, natomiast protopektyny wyodrębniano dwoma sposobami:

a) przez ekstrakcję 0,02 M roztworem EDTA (wersenianu dwusodowego) o pH 10,6,

b) przez ekstrakcję 0,02 M roztworem EDTA o pH 4,5.

Z różnicy pomiędzy wynikami uzyskanymi po ekstrakcji protopektyn zasadowym i kwaśnym roztworem EDTA wnioskowano o ilości tych połączeń związanych z jonami wapnia i magnezu (Blaim i Przeszlakowska 1968). Otrzymane wyniki procentowej zawartości pektyn rozpuszczalnych oraz dwóch frakcji protopektyn w węzłach i międzywęźlach pszenicy 'Eka Nowa' poddanej działaniu CCC, zestawiono w tabeli 3.

Tabela 3 — Table 3

Zawartość pektyn i protopektyn w węzłach i międzywęźlach pszenicy 'Eka Nowa' poddanej działaniu CCC (% pektynianu wapnia w suchej masie surowca)

The results of the quantitative determination of pectins and protopectins (calcium pectate — per cent on dry weight) in nodes nad internodes of the wheat culms ('Eka Nowa') treated with CCC *

| Frakcje substancji pektynowych<br>Fractions of pectic substances | | | Części źdźbła<br>Parts of wheat stalks | Kontrola<br>Control | CCC |
|---|---|---|---|---|---|
| Pektyny<br>Pectins | | | węzły<br>nodes | 0,89 | 1,08 |
| | | | międzywęźla<br>internodes | 0,26 | 0,36 |
| Protopektyny<br>Protopectins | pH ekstrakcji<br>pH during extraction | 10,6 | węzły<br>nodes | 0,80 | 1,03 |
| | | | międzywęźla<br>internodes | 0,34 | 0,58 |
| | | 4,5 | węzły<br>nodes | 0,34 | 0,51 |
| | | | międzywęźla<br>internodes | 0,18 | 0,18 |

* The results were worked out statistically with analysis of variance using Student's test for significance (n = 15). The numbers differ significantly at P = 0.05.

Statystycznie udowodniono, że węzły zawierają trzykrotnie więcej pektyn oraz dwa razy więcej protopektyn ekstrahowanych przy pH 10,6 w porównaniu z zawartością tych połączeń w międzywęźlach. Pod wpływem CCC zwiększyła się zawartość pektyn i protopektyn zarówno w węzłach, jak i w midędzywęźlach (średnio o 28% więcej protopektyn w węzłach i o 70% więcej tych związków w międzywęźlach, w odniesieniu do kontroli przyjętej jako 100%). Z drugiej strony, wyniki ilościowego oznaczania protopektyn po ekstrakcji ich 0,02 M roztworem EDTA o pH 4,5 wskazują, że chlorek chlorocholiny nie wpływa na zawatrość tej frakcji protopektyn w międzywęźlach, natomiast powoduje zwiększenie ich ilości o 50% w węzłach. Różnica pomiędzy zawartością proto-

pektyn wyodrębnionych 0,02 M roztworem EDTA przy pH 10,6 i 4,5 z międzywęźli roślin kontrolnych wynosi 0,16%, a ta sama różnica w pszenicy traktowanej chlorkiem chlorocholiny wynosi 0,40%. Wyodrębniając te związki 0,02 M roztworem EDTA o pH 4,5 stwierdzono, że zawartość ich w międzywęźlach roślin kontrolnych jest taka sama, jak w międzywęźlach pszenicy traktowanej CCC (tab. 3). Sugerowałoby to, że preparat ten powoduje zwiększenie frakcji pektyn nierozpuszczalnych, związanych z wapniem i magnezem. Przemawia również za tym istotny wzrost zawartości składników mineralnych, a zwłaszcza jonów wapnia (o 50%) w tkankach źdźbła poddanego działaniu CCC (tab. 2). Jako kation dwuwartościowy wiąże on grupy karboksylowe łańcuchów poligalakturonowych i może powodować, że rozciągliwość ścian komórkowych jest o wiele mniejsza, aniżeli wtedy, gdy grupy karboksylowe tych połączeń są związane przy pomocy mostków wodorowych lub też zmetylowane. W ostatnim przypadku wiązania wodorowe zostają zastąpione przez jeszcze słabsze siły Van der Waalsa i obserwuje się maksymalną plastyczność ścian (Bennet-Clark 1956) i intensywny wzrost komórki. Tak więc, przy zbyt dużym stężeniu jonów wapniowych może nastąpić uszytwnienie ścian i zahamowanie wzrostu. Uzyskane obecnie oraz we wcześniejszych pracach (Blaim i Przeszlakowska; 1967; Blaim i wsp. 1970) wyniki zdają się potwierdzać wysuniętą przez nas hipotezę odnośnie mechanizmu działania chlorku chlorocholiny (CCC) w usztywnianiu źdźbła, zwiększaniu jego odporności na czynniki mechaniczne oraz bezpośredniego udziału substancji pektynowych w tym procesie. Zaobserwowany wzrost zawartości zarówno substancji pektynowych, jak i białka w ścianach komórkowych źdźbła ma także niewątpliwe znaczenie w gospodarce wodnej rośliny i odporności źdźbła na czynniki klimatyczne.

## STRESZCZENIE

Przeprowadzono frakcjonowanie ściany komórkowej źdźbła pszenicy, odmiany 'Eka Nowa' poddanej działaniu CCC. Składniki ścian komórkowych oznaczono ilościowo, a frakcje zawierające wielocukry poddano hydrolizie, a następnie analizie chromatograficznej.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że pod wpływem działania chlorku chlorocholiny zwiększa się zawartość cukrów redukujących (o 30%), białka (o 8%), pektyn rozpuszczalnych (o 70%) oraz składników mineralnych. Zawartość ligniny, hemicelulozy „A", hemicelulozy „B" oraz α-celulozy nie ulega żadnym zmianom (tab. 1). Obserwując duży wzrost zawartości pektyn rozpuszczalnych w ścianach komórkowych źdźbła poddanego działaniu CCC, przebadano następnie węzły i międzywęźla pszenicy pod kątem występowania pektyn i protopektyn oraz wpływu wspomnianego preparatu na zawartość różnych frakcji połączeń pektynowych. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że CCC istotnie zwiększa zawartość pektyn rozpuszczalnych i protopektyn zarówno w węzłach, jak i w międzywęźlach. Pod wpływem CCC zwiększa się zawartość związków

pektynowych związanych z jonami wapnia, a zwłaszcza w międzywęźlach pszenicy (tab. 3).

Na uwagę zasługuje również wzrost zawartości składników mineralnych (o 28%), a zwłaszcza jonów wapnia (o 50%).

Polisacharydy ścian komórkowych źdźbła są chemicznie niejednorodne w swojej budowie i każda z analizowanych frakcji wykazuje złożoną budowę (rys. 1 i 2). Nie zaobserwowano zmian w jakościowym składzie wielocukrów ściany komórkowej źdźbła pszenicy traktowanej chlorkiem cholorocholiny, w porównaniu do roślin kontrolnych.

## SUMMARY

Cell walls of wheat culms var. 'Eka Nowa' pretreated with 2-chloroethyl-trimethyl-ammonium chloride (CCC) were fractionated. The components of the cell wall were determined quantitatively, and after hydrolysis polysaccharide fractions were analyzed chromatographically.

It was found in the investigations that CCC induced an increase in the content of reducing sugars by an average of 30%, soluble pectins (70%), proteins (8%) and mineral salts. The amounts of lignins, hemicellulose „A", hemicellulose „B" and α-cellulose remain constant under these conditions (Table 1). A significant increase of soluble pectins in the material treated with CCC was also observed. It was demonstrated that CCC induces a significant increase in the content of pectins and protopectins in wheat nodes and internodes.

CCC — treatment leads to an increase of the content of pectic substances bound with calcium ions, especially in wheat internodes (Table 3).

Noteworthy is the increasing content of mineral ions (28%), especially of calcium (50% — Table 2).

The cell wall polysaccharides of wheat culms are chemically heterogeneous and each of the analyzed fractions contains various monosaccharides (Fig. 1 and 2). Changes in the qualitative composition of polysaccharides of the cell vall of wheat culms treated with CCC were not observed.

## LITERATURA

Albersheim P., English P. D., Jones T. M., 1969, Biochemistry of the cell wall in relation to infective processes, Ann. Rev. Phytopathology 7: 171-194.

Bateman D. F., Millar R. L., 1966, Pectic enzymes in tissue degradation, Ann. Rev. Phytopathology 4: 119-146.

Bennet-Clark T. A., 1956, Salt accumulation and the mode of action of plant growth substances. A. preliminary hypothesis [W] The chemistry and mode action of plant growth substances, Ed.R.L. Wain, F. Wightman. London. Butterworth Scient. Publ. p. 248.

Blaim K., Przeszlakowska M., 1967, Influence of CCC on the content of pectic substances in wheat stalks, Bull. Acad. Polon. Sci. ser. biol. 15: 445-448.

Blaim K., 1968, Rola wapnia w zjawiskach odpornościowych roślin, Post. Nauk Roln. 15, 6 (114): 51-58.

Blaim K., Przeszlakowska M., 1968, Wyodrębnianie i oznaczanie substancji pektynowych w materiale roślinnym., Ann. Univ. M .Curie-Skłodowska, Sect. AA, 23: 257-263.

Blaim K., Przeszlakowska M., Szynal J., 1970, Studies on the mechanism of action of (2-chloroethyl) trimethyl-ammonium chloride (CCC) on the

wheat growth and on its resistance to lodging, Zesz. Nauk. Uniw. M. Kopernika, Ser. biol. 13: 211-216.

Góra B., 1967, Możliwości stosowania CCC w uprawie roślin, Warszawa, CBR.

Jermyn M. A., Isherwood F. A., 1956, Changes in the cell wall of the pear during ripening, Biochem. J. 64: 123-132.

Knypl J. S., 1971, O mechanizmie działania retardantów na wzrost i rozwój roślin. Cz. III. Aktywność enzymatyczna i skład chemiczny roślin poddanych działaniu retardantów wzrostu, Post. Nauk Roln. 5: 43-60.

Listowski A., Żebrowski Z., 1967, Sprawozdanie z doświadczeń przeprowadzonych w roku 1965-1966 nad działaniem CCC, Praca zbiorowa IUNG, Puławy.

Lowry J. O. H., Rosebrough N. J., Farr R. L., Randall R. J., 1951, Protein measurement with the Folin reagent, J. Biol. Chem. 193: 265-277.

Nevins D. J., English P. D., Albersheim P., 1968, Changes in cell wall polysaccharides associated with growth, Plant Physiol. 43: 914-922.

Northcote D. H., 1958, The cell walls in higher plants, their composition, structure and growth, Biol. Rev. 33: 53-102.

Oktaba W., 1966, Elementy statystyki matematycznej i metodyka doświadczalnictwa, PWN, Warszawa.

Oktaba W., 1967, Metody statystyki matematycznej w doświadczalnictwie, PWN, Warszawa.

Plant Z., Halevy A. H,, 1966, Increasing the regeneration of wheat plants following wilting by treatment with two growth retarding chemicals Natuvissenschaften 19 (53): 509.

Przeszlakowska M., 1973, Chromatograficzna analiza substancji pektynowych źdźbła zbóż, Acta Agrobotanica 26: 115-122.

Rubin B., Arcichowska J., 1971, Biochemia i fizjologia odporności roślin, PWRiL, Warszawa.

Uskow A. J., Pjatigin A. W., 1969, Wlijanije CCC na rost i wodnyj rieżym razlicznych sortow ozimoj pszenicy, Fizjołogija rastienij 16 (wyp. 4): 721.

Wise L. E., Murphy M., D'Addieco A. A., 1946, Paper Tr. J., 122, 43 [cyt. wg Jermyn M. A., Isherwood F. A., 1956, Biochem. J. 64: 123-132].

Wood R. K. S., 1960, Pectic and cellulolytic enzymes in plant disease, Ann. Rev. Plant. Physiol. 299-322.