Wpływ CCC i chlorowodorku dwuetyloaminy na rozwój niektórych gatunków *Chlorella*

Influence of chlorcholine chloride (CCC) and diethylamine hydrochloride on the development of some Chlorella species

B. CZECZUGA i R. CZERPAK

WSTĘP

Problem regulatorów wzrostu roślin stał się szczególnie ciekawy od chwili stwierdzenia przez Tolberta (1960) właściwości antygiberelinowych chlorku chlorocholiny (CCC). Stwierdził on, poraz pierwszy (1960, 1960a), że analogi choliny powodują karłowacenie roślin. Szczegółowe badania tego autora na pszenicy wykazały, że wzrost karłowacenia roślin i ubytek ogólnej masy jest wprost proporcjonalny do zwiększenia dawki CCC. Do podobnych wniosków doszli Linser i Kühn (1962) prowadząc badania na pszenicy jarej i życie stosując przy tym zwiększone nawożenie azotowe.

Ci sami autorzy oraz Humphries (1963) wykazali, że najlepsze wyniki działania CCC otrzymuje się przez wprowadzenie go do gleby lub kultur wodnych. Ponadto młode rośliny są najbardziej podatne na działanie chlorku 2-chloroetylotrójmetryloamonowego.

Wpływ CCC na zmiany morfologiczne roślin uzależniony jest przede wszystkim od stężenia tego związku, a także od stadium rozwojowego rośliny, warunków klimatycznych i podłoża. Najwyraźniej CCC działa na roślinę w zakresie stężeń 10^{-2} — 10^{-7} M, a efekty działania są najlepiej dostrzegalne po upływie 5—7 dni. Duże dawki CCC powodują chlorozę liści, nekrozy i martwice. Stężenia począwszy od 10^{-2} M powodują początkowo lekkie pobudzenie wzrostu, a następnie szybkie hamowanie (Wittwer 1960; Tolbert 1960, 1960a). Pod wpływem CCC liście pszenicy były krótsze i szersze (Tolbert 1960), a tytoniu dłuższe i grubsze, o większej powierzchni i ciemnozielonym zabarwieniu (Humphries 1963).

Działanie przyspieszające CCC na biosyntezę chlorofilu spostrzegli Pilet i Supniewska (1961) oraz Humphries (1963). Ostatni wykazał ponadto zmniejszenie się tempa fotosyntezy wraz ze wzrostem zawartości chlorofilu.

Według Tolberta (1960) z grupy związków choliny najaktywniejszym biologicznie okazał się CCC. Również inne związki tego typu mające podstawową grupę trójmetryloamonową oraz rodnik CH_2X są aktywne biologicznie (Supniewska i Dohnal 1964).

Regulatory wzrostu typu CCC rodują duże nadzieje w rolnictwie, ogrodnictwie i kwieciarstwie. Michniewicz (1964), Michniewicz i Kentzer (1965) i Michniewicz i inni (1965) wykazali, że pomidory hodowane z dodatkiem CCC na pożywe Knopa są bardziej odporne na mróz i choroby infekcyjne wywołane głównie przez grzyby oraz wykazują znaczny wzrost witaminy C. Natomiast w rolnictwie CCC może zapobiegać wyleganiu zbóż.

Mając na uwadze powyższe dane piśmiennictwa podjęliśmy próbę przebadania wpływu CCC i chlorowodoru dwuetyloaminy (dotąd nie opisywanego w literaturze) na wzrost i rozwój glonów z rodzaju *Chlorella*.

MATERIAŁ I METODYKA

Jako materiał doświadczalny posłużyły następujące gatunki glonów z rodzaju *Chlorella*: *Chl. terricola* Hollerb., *Chl. vulgaris* Beyer., *Chl. ellipsoidea* Gerneck. i *Chl. pyrenoidosa* Chick.* Do eksperymentu użyto czystych i młodych kultur glonów wyhodowanych w pracowni Katedry Biologii Akademii Medycznej w Białymstoku.

W naszym przypadku badano wpływ dwóch regulatorów wzrostu, takich jak CCC (wyprodukowany przez Spółdzielnię Chemiczną "Permedia" w Lublinie) i chlorowodoru dwuetyloaminy**.

Chlorowodorek dwuetyloaminy o wzorze strukturalnym

jest II rzędową solą amonową o ogólnym schemacie budowy podobnym do CCC. Jest to biała, krystaliczna substancja, silnie higroskopijna o ciężarze cząsteczkowym 109,5 g i temperaturze topnienia 222–223°.

Po wstępnych badaniach na grochu i jęczmieniu stwierdzając jego słabą aktywność biologiczną przystąpiliśmy do szczegółowych badań nad glonami z rodzaju *Chlorella*. W odniesieniu do glonów związek ten okazał się silnie aktywny biologicznie o właściwościach podobnych do CCC, a nawet nieco silniejszych.

Doświadczenie przeprowadzono w kolbach Erlenmayera o pojemności 250 ml zatkanych korkiem bakteriologicznym w warunkach możliwie jak najbardziej jałowych. Hodowlę glonów z rodzaju *Chlorella* prowadzono na zmodyfikowanej pożywe Knopa. Kultury glonów trzymano pod digestorium specjalnie przystosowanym do hodowli glonów. W czasie eksperymentu w pomieszczeniu tym temperatura wahała się w granicach 21 do 24°C, zaś intensywność oświetlenia była w zakresie 350 lux.

* *Chlorella ellipsoidea* pochodzi ze Sbirka kultur autotrofnych organizmu CSAV w Pradze, pozostałe gatunki *Chlorella* z Katedry Fizjologii Roślin Uniwersytetu w Mińsku.

** Związek powyższy otrzymaliśmy w Katedrze Biologii AMB działając chlorowodorek na dwuetyloaminę produkcji niemieckiej firmy Radel de Haën A. G. Seelze b. Hannover.

Do każdej kolbki dodano po 50 ml pożywki i po 2 ml czystej kultury danego gatunku glonów uprzednio dobrze wymieszanej. Przebadano wpływ wyżej wymienionych substancji wzrostowych w następujących stężeniach: 10^{-2} ; $5 \cdot 10^{-3}$; 10^{-3} ; $5 \cdot 10^{-4}$; 10^{-4} ; $5 \cdot 10^{-5}$; 10^{-5} ; $5 \cdot 10^{-6}$; 10^{-6} ; $5 \cdot 10^{-7}$; 10^{-7} mola. Kontrolę stanowiły trzy próby glonów bez dodania związków aktywnych biologicznie. 10-ego dnia od czasu założenia hodowli dodawaliśmy po 50 ml pożywki Knopa i substancje wzrostowe w ilości takiej jak przy założeniu kultury.

W takich warunkach hodowlę glonów trzymaliśmy od 20 do 24 dni badając wpływ wyżej wymienionych regulatorów wzrostu na tempo wzrostu, wielkość komórek, ich kształt oraz zawartość ogólnego chlorofilu w zależności od stężenia tych substancji. W tym celu z każdej hodowli glonów pobieraliśmy po 1 ml cieczy na początku doświadczenia, po upływie 5, 10, 15—17 i 20—24 dni. Wszystkie próbki natychmiast utrwalano 4% formaliną, a następnie z każdej próbki liczono ilość komórek w 30 dużych kratkach siatki komory Thoma i obliczano średnią zawartość w 1 dużej kratce. Z kolei przeliczano liczbę komórek na 1 ml danej kultury.

Po zakończeniu hodowli pobierano 5, lub 10 ml glonów, sączone przez gęsty sączek bibułowy, a następnie zalewano je 86% alkoholem etylowym. Po całkowitej ekstrakcji barwników mierzono fotokolorymetrycznie zawartość ogólnego chlorofilu na kolorymetrze Lumetron Mod. 400A przy długości fali 663 m μ .

Ponadto dokonywano pomiarów wielkości komórek za pomocą okularu mikrometrycznego. Z każdej próbki glonów mierzono 50 komórek, a następnie obliczano ich średnią wielkość podając równocześnie ich wymiary minimalne i maksymalne.

Oprócz tego mierzono pH poszczególnych kultur za pomocą pehametru typu LBS-63A.

Wykonano także fotografie glonów kontrolnych i glonów o dużej zawartości substancji aktywnych biologicznie, które wyraźnie różniły się wielkością komórek.

WYNIKI BADAŃ

Uzyskane wyniki dotyczące wpływu CCC i chlorowodorku dwuetyloaminy na tempo wzrostu niektórych gatunków *Chlorella* przedstawione są w tabelach 1—2. Ujęcie graficzne wyżej wymienionych wyników jest uwidocznione na ryc. 1—4. Tabela 1(I) przedstawia dane obrazujące szybkość wzrostu kultury *Chlorella terricola* z których wynika, że CCC działa hamująco na wzrost *Chl. terricola* począwszy od stężenia $5 \cdot 10^{-4}$ M do 10^{-2} M. Natomiast w granicach stężeń 10^{-4} — 10^{-6} CCC działa minimalnie stymulująco na tempo wzrostu.

W przypadku chlorowodorku dwuetyloaminy widzimy, że jego hamujące działanie na wzrost *Chlorella terricola* jest silniejsze w porównaniu z działaniem CCC od chwili założenia hodowli do 15-go dnia, zaś 20-go dnia efekt działania jest odwrotny i zaczyna się od stężenia 10^{-4} M i dość silnie wzrasta w kierunku stężenia 10^{-2} M. W zakresie stężeń $5 \cdot 10^{-5}$ — 10^{-6} działa dość wyraźnie stymulująco.

Tabela 1 — Table 1

Ilość komórek *Chlorella terricola* Hollerb., *Chl. vulgaris* Beyer., *Chl. ellipsoidea* Gerneck. w zależności od stężenia substancji wzrostowej (tys./ml)
Quantity of *Chlorella* cells in dependence on concentration of growth substances (thousands/ml)

Czas trwania dośw. w dniach Time of ex- periment days Stę- żenie w molach Concentra- tion moles	Początek doświad- czenia Beginning of expt.	Chlorek cholerocholiny (CCC)				Chlorowodorek dwuetyloaminy Diethylamine hydrochloride			
		5	10	15	20	5	10	15	20
I. <i>Chl. terricola</i> Hollerb.									
10 ⁻²	637,5	700	2275	4500	5900	425	375	1395	750
5•10 ⁻³	637,5	975	3675	7400	10150	500	500	2550	1750
10 ⁻³	637,5	1975	6775	11250	13700	1300	3000	8550	16250
5•10 ⁻⁴	637,5	2200	8500	12350	16450	1675	4425	9600	18350
10 ⁻⁴	637,5	2700	9650	15250	19850	2200	7875	14750	22100
5•10 ⁻⁵	637,5	2725	9975	15950	22200	2250	9700	17450	26200
10 ⁻⁵	637,5	2725	9125	14200	22400	2500	9975	17800	27650
5•10 ⁻⁶	637,5	2775	9350	15300	22100	2450	9400	14250	25600
10 ⁻⁶	637,5	2800	9075	15400	22850	2525	8400	13900	25300
5•10 ⁻⁷	637,5	2325	9025	15900	21400	2400	9100	14100	24650
10 ⁻⁷	637,5	2275	8950	15200	20350	2225	8525	13950	23700
Kontrola Control	637,5	2300	9325	14550	22050	2300	9325	14550	22050

II. *Chl. vulgaris* Beyer.

10-2	1325	925	1125	1300	1850	950	1450	1350	2800
5•10 ⁻³	1325	1025	1300	3100	4350	1125	2025	3550	3750
10 ⁻³	1325	1350	2425	7450	10000	3050	3125	5100	7000
5•10 ⁻⁴	1325	2875	4500	9750	17500	3725	3575	6000	8250
10 ⁻⁴	1325	3550	4925	13200	22150	3800	4200	7800	13700
5•10 ⁻⁵	1325	3525	5100	15560	24550	3850	4275	8900	17250
10 ⁻⁵	1325	3575	5150	16000	26400	3975	4450	12150	20550
5•10 ⁻⁶	1325	3850	5050	14350	24250	4150	4700	14250	23800
10 ⁻⁶	1325	3725	5025	15650	24500	3650	4825	13750	24850
5•10 ⁻⁷	1325	3600	4925	15250	25200	3400	4375	14800	25400
10 ⁻⁷	1325	3500	5125	15400	25000	3450	4675	15400	25900
Kontrola									
Control	1325	3675	4900	16100	24920	3675	4900	16100	24920

III. *Chl. ellipsoidea* Gerneck.

10-2	300	900	1600	2600	3250	450	350	400	1300
5•10 ⁻³	300	1600	2875	4200	5750	700	750	950	2250
10 ⁻³	300	2025	4475	6150	6750	1400	2025	2550	3550
5•10 ⁻⁴	300	2200	5650	7150	9400	2025	3450	4200	5250
10 ⁻⁴	300	2525	6150	8450	11450	2500	5400	5500	8500
5•10 ⁻⁵	300	2800	7000	9200	13100	2550	6250	6800	10200
10 ⁻⁵	300	2850	7650	9800	14050	2700	6950	8500	14000
5•10 ⁻⁶	300	2875	7950	10350	14750	2600	7800	9200	14850
10 ⁻⁶	300	2800	7750	10200	14900	2775	7625	10150	14550
5•10 ⁻⁷	300	2850	7850	10100	15250	2750	7575	10050	14800
10 ⁻⁷	300	2800	7800	10150	14850	2825	7775	9900	15750
Kontrola									
Control	300	2780	8075	9900	15050	2780	8075	9900	15050

Tabela 2 — Table 2

Ilość komórek *Chlorella pyrenoidosa* Chick. w zależności od stężenia chlorku chlorocholiny (w tys./ml)

Quantity of *Chlorella pyrenoidosa* Chick. cells in dependence on concentrations of growth substances (thousands/ml)

<div>Czas trwania dośw.w dniach Time of ex- periment days</div> <div>Stę- żenie w molach Concentra- tions moles</div>	Początek doświadczenia Beginning of experiment	5	10	15	20
10 ⁻²	578,3	775	1675	1850	3400
5·10 ⁻³	578,3	975	1850	3500	4650
10 ⁻³	578,3	1475	2550	4150	5675
5·10 ⁻⁴	578,3	1600	2775	4425	6950
10 ⁻⁴	578,3	1725	3475	6350	10050
5·10 ⁻⁵	578,3	2025	3750	6550	10600
10 ⁻⁵	578,3	2000	4025	6500	13650
5·10 ⁻⁶	578,3	1950	3675	7075	13975
10 ⁻⁶	578,3	1975	3925	7800	12950
5·10 ⁻⁷	578,3	2075	3700	7825	13700
10 ⁻⁷	578,3	2000	3675	7575	12725
Kontrola Control	578,3	1900	3510	7040	13775

Tabela 1(II) przedstawia wzrost *Chlorella vulgaris* w zależności od stężenia substancji wzrostowych i czasu trwania hodowli.

Z danych liczbowych widzimy, że tempo wzrostu pod wpływem CCC w porównaniu z kontrolą maleje w kierunku stężenia od 10^{-4} do 10^{-2} M, zaś nieznaczne działanie pobudzające wzrost zarysowuje się w granicach stężeń 10^{-5} — 10^{-6} M. Natomiast chlorowodorek dwuetyloaminy wpływa o wiele silniej hamująco na wzrost *Chlorella vulgaris* w odniesieniu do CCC w granicach stężeń 10^{-2} — 10^{-4} M, a szczególnie to się uwypukla przy stężeniu 10^{-3} i $5 \cdot 10^{-4}$ M. Zależność ta jest proporcjonalna w czasie, nawet do 20-go dnia trwania hodowli.

Stymulujące jego działanie jest minimalne w granicach stężeń 10^{-5} — 10^{-6} M, przy czym jest ono nieco słabsze między 10 a 20 dniem hodowli w porównaniu do CCC.

Tabela 1(III) zawiera wyniki badań nad *Chlorella ellipsoidea*. Koncentracja początkowa kultury tego gatunku wynosiła 300 tys. komórek/ml. CCC działa hamująco na wzrost *Chlorella ellipsoidea* począwszy od stężenia $5 \cdot 10^{-5}$ M w kierunku wzrastającym do 10^{-2} M.

Wpływ stymulujący jest bardzo nieznaczny przy stężeniach 10^{-5} — $5 \cdot 10^{-7}$ M. W porównaniu do CCC chlorowodorek dwuetyloaminy działa co najmniej

1

2

3

Ryc. 1—3. Koncentracja komórek *Chlorella* w zależności od stężenia regulatorów wzrostu i czasu trwania hodowli

Quantity of *Chlorella* cells (abscissa) in dependence on concentration of growth regulators (ordinate) and time of culture (days).

A — CCC; B — chlorowodorek dwuetyloaminy (diethylamine hydrochloride)

1 — *Chlorella terricola* Hollerb., 2 — *Chl. vulgaris* Bayer., 3 — *Chl. ellipsoidea* Gerneck.

Tabela 3 — Table 3

Zawartość chlorofilu oraz pH w zależności od stężenia substancji wzrostowych
Chlorophyll content and pH in dependence on concentration of growth substances

Zawartość chlorofilu Chlorophyll content γ/ml Stężenie w molach Concentration moles	Chlorek chlorocholiny CCC				pH	Chlorowodorek dwuetyloaminy Diethylamine hydrochloride			pH
	<i>Chl. terricola</i>	<i>Chl. vulgaris</i>	<i>Chl. ellipsoidea</i>	<i>Chl. pyrenoidosa</i>		<i>Chl. terricola</i>	<i>Chl. vulgaris</i>	<i>Chl. ellipsoidea</i>	
10^{-2}	2,88	1,04	2,66	1,96	5,65	1,44	2,70	1,14	5,95
$5 \cdot 10^{-3}$	3,04	3,57	4,00	2,98	5,45	1,84	5,76	2,00	5,15
10^{-3}	4,56	5,58	5,70	3,74	5,80	4,80	6,27	7,20	5,30
$5 \cdot 10^{-4}$	4,60	7,80	6,80	4,08	6,40	5,46	7,23	11,40	5,45
10^{-4}	5,90	10,20	10,50	5,75	7,10	6,72	9,00	11,54	5,65
$5 \cdot 10^{-5}$	6,72	10,80	11,40	6,10	7,65	7,74	9,80	12,82	6,20
10^{-5}	7,92	11,80	13,00	7,75	7,80	7,10	10,86	13,00	7,40
$5 \cdot 10^{-6}$	7,80	10,50	11,50	8,75	7,85	7,40	11,25	10,50	7,65
10^{-6}	7,86	11,25	12,00	9,20	7,75	7,08	10,20	11,40	7,80
$5 \cdot 10^{-7}$	7,18	10,20	10,85	8,94	7,80	6,76	11,40	11,50	7,70
10^{-7}	7,44	10,75	12,08	8,25	7,90	7,38	11,56	12,50	7,75
Kontrola Control	7,56	10,60	11,80	8,50	7,80	7,56	11,60	11,80	7,80

Tabela 4 — Table 4

Wpływ substancji wzrastowych na wielkość komórek *Chlorella*
Influence of growth substances on *Chlorella* cell size

Wielkość komórek Cell size μ Stężenie w molach Concentration, moles	Chlorek chorocholiny (CCC)			Chlorowodorek dwutyloaminy Diethylamine hydrochloride		
	<i>Chl. terricola</i>	<i>Chl. vulgaris</i>	<i>Chl. ellipsoidea</i>	<i>Chl. terricola</i>	<i>Chl. vulgaris</i>	<i>Chl. ellipsoidea</i>
10^{-2}	3,8(2,1—5,6)	5,1(3,0—8,1)	5,2(3,3—8,4)	4,8(2,5—7,6)	5,5(3,7—8,2)	5,9(3,8—9,3)
$5 \cdot 10^{-3}$	3,5(1,9—5,3)	4,1(2,8—6,2)	5,1(3,1—7,7)	5,1(2,7—8,0)	4,8(2,8—6,4)	5,4(3,6—7,0)
10^{-3}	3,3(1,8—4,9)	3,9(2,8—5,6)	4,8(2,8—7,1)	4,3(2,4—6,8)	3,9(2,8—5,4)	4,9(3,4—6,8)
$5 \cdot 10^{-4}$	3,2(2,0—5,1)	3,6(2,2—5,5)	4,2(3,1—6,2)	3,8(2,2—6,7)	3,4(2,2—4,5)	4,7(2,6—5,9)
10^{-4}	3,1(1,9—4,9)	3,3(2,1—5,0)	4,1(2,8—5,8)	3,6(1,9—6,3)	3,2(2,1—4,7)	4,5(2,9—5,8)
$5 \cdot 10^{-5}$	2,9(1,7—4,6)	2,9(1,7—4,6)	4,0(2,5—6,1)	3,3(2,1—5,8)	2,7(1,7—4,1)	4,1(2,2—4,9)
10^{-5}	2,0(1,9—5,2)	2,7(1,6—4,1)	3,8(2,4—6,0)	3,2(2,0—5,4)	2,6(1,6—4,3)	3,8(2,3—5,4)
$5 \cdot 10^{-6}$	2,8(1,8—5,0)	2,9(1,5—4,0)	4,0(2,2—6,2)	3,0(1,9—5,7)	2,8(1,5—4,0)	4,1(2,2—6,1)
10^{-6}	3,1(1,8—4,8)	2,8(1,6—4,2)	3,9(2,1—5,9)	2,9(1,8—5,2)	2,7(1,6—4,2)	4,0(2,0—6,2)
$5 \cdot 10^{-7}$	3,0(1,9—5,1)	2,8(1,5—4,1)	4,0(2,3—5,8)	3,1(1,9—6,1)	2,9(1,8—4,3)	3,9(2,1—6,0)
10^{-7}	2,9(1,7—4,9)	2,8(1,5—4,1)	4,0(2,5—6,1)	3,0(1,8—5,3)	2,8(1,3—4,0)	4,0(2,3—6,3)
Kontrola Control	3,0(1,8—5,0)	2,7(1,4—3,9)	3,9(2,0—6,3)	3,0(1,8—5,0)	2,7(1,4—3,9)	3,9(2,0—6,3)

dwukrotnie silniej hamująco na wzrost *Chlorella ellipsoidea* przy stężeniach do 10^{-2} do $5 \cdot 10^{-4}$ M. Jego działanie hamujące sięga w tym przypadku do stężenia $5 \cdot 10^{-6}$ M. Minimalny wpływ stymulujący daje się zauważyć w granicach stężeń 10^{-6} — 10^{-7} M, przy czym w porównaniu do CCC nie ma istotnych różnic w czasie trwania hodowli.

Ryc. 4. Koncentracja komórek *Chlorella pyrenoidosa* Chick. w zależności od stężenia CCC i czasu trwania hodowli

Quantity of *Chl. pyrenoidosa* Chick. cells (abscissa) in dependence on concentration of CCC (ordinate) and time of culture (days).

Ryc. 5. Zawartość chlorofilu w hodowlach poszczególnych gatunków *Chlorella* w zależności od stężenia regulatorów wzrostu

Chlorophyll content in cultures of individual *Chlorella* species (abscissa) in dependence on concentration of growth regulators (ordinate).

a - *Chl. terricola* Hollerb., b - *Chl. pyrenoidosa* Chick., c - *Chl. vulgaris* Beyer., d - *Chl. ellipsoidea* Gerneck.
A - CCC; B - chlorowodorek dwuetyloaminy (diethylamine hydrochloride)

Tabela 2 skupia dane dotyczące wzrostu *Chlorella pyrenoidosa* pod wpływem CCC, który działa hamująco w tempie malejącym od 10^{-2} do 10^{-4} M, szczególnie w pierwszych 10 dniach trwania hodowli. Natomiast od 10-go do 24-go dnia hodowli

Ryc. 6. Wartość pH i stężenia regulatorów wzrostu
pH values and concentration of growth regulators

a — CCC; b — chlorowodorek dwuetyloaminy (diethylamine hydrochloride)

Ryc. 7. Wielkość komórek poszczególnych gatunków *Chlorella* w zależności od stężenia regulatorów wzrostu

Cell size of individual *Chlorella* species (abscissa) in dependence on concentration of growth regulators (ordinate).

a — *Chl. terricola* Hollerb., b — *Chl. vulgaris* Beyer., c — *Chl. ellipsoidea* Gerneck.

A — CCC; B — chlorowodorek dwuetyloaminy (diethylamine hydrochloride)

działanie hamujące daje się zauważyć również przy stężeniu 10^{-5} M. Wpływ stymulujący CCC na *Chlorella pyrenoidosa* jest dość wyraźny w granicach stężeń 10^{-6} — 10^{-7} M.

Tabela 3 przedstawia zawartość chlorofilu przy różnych stężeniach chlorowodoru dwuetyloaminy i CCC oraz wartości pH. Graficznie uwidocznione jest to na ryc. 5 i ryc. 6.

Ryc. 8. Wielkość i kształt komórek *Chlorella ellipsoidea* Gerneck. przy różnym stężeniu regulatorów wzrostu ($\times 600$)

Cell size and shape of *Chl. ellipsoidea* Gerneck. at various concentrations of growth regulators.

a — kontrola (control); b — Chlorowodorek dwuetyloaminy, stężenie 10^{-2} M (diethylamine hydrochloride, 10^{-2} M concentration); c — chlorowodorek dwuetyloaminy, stężenie $5 \cdot 10^{-3}$ M (diethylamine hydrochloride 5×10^{-3} M concentration); d — CCC, stężenie $5 \cdot 10^{-3}$ M (CCC, 5×10^{-3} M concentration)

Pod wpływem CCC w hodowli *Chlorella terricola* ilość chlorofilu maleje począwszy od stężenia $5 \cdot 10^{-5}$ M w kierunku 10^{-2} M, co ma ścisły związek z ilością komórek w czasie wzrostu hodowli. Przy stężeniach 10^{-5} – 10^{-6} M zawartość chlorofilu ma lekkie tendencje wyżkowe w porównaniu z kontrolą. Na zawartość chlorofilu u *Chlorella pyrenoidosa* CCC działa hamująco przy stężeniach 10^{-2} – 10^{-5} μ , a przy stężeniach $5 \cdot 10^{-6}$ – $5 \cdot 10^{-7}$ μ działa stosunkowo nieznacznie stymulująco. Hodowla *Chlorella vulgaris* pod działaniem CCC ma zmniejszoną ilość chlorofilu w odnie-

sieniu do kontroli w granicach stężeń 10^{-2} – 10^{-4} M, a nawet przy stężeniu 10^{-2} M ma tendencje spadkowe do zera. Działanie stymulujące ogranicza się dość wyraźnie w granicach stężeń 5.10^{-5} – 5.10^{-7} M. Zaś zawartość chlorofilu u *Chlorella ellipsoidea* pod wpływem CCC maleje począwszy od stężenia 5.10^{-5} M w kierunku 10^{-2} M, a wzrasta nierównomiernie od 10^{-5} do 10^{-7} M.

Biorąc pod uwagę wpływ chlorowodorku dwuetyloaminy na zawartość chlorofilu widzimy, że u *Chlorella terricola* ilość chlorofilu maleje w kierunku od 10^{-4} do 10^{-2} M, a minimalnie wzrasta przy stężeniach 5.10^{-5} – 5.10^{-6} M. Zawartość chlorofilu u *Chlorella vulgaris* przedstawia się w ten sposób, że przy stężeniach od 10^{-5} do 10^{-2} M maleje, zaś przy stężeniach 5.10^{-6} i 5.10^{-7} ma tendencje zwyżkowe. Chlorowodorek dwuetyloaminy w hodowli *Chlorella ellipsoidea* powoduje obniżenie ilości chlorofilu przy stężeniach 10^{-4} – 10^{-2} M, a stymuluje od 5.10^{-6} do 10^{-5} M.

Zależność pomiędzy stężeniem CCC a pH ma następujący przebieg: od stężenia 10^{-7} do 5.10^{-5} M kultury mają pH lekko zasadowe (7,7–7,9), następnie pH maleje, gdzie przy stężeniu 5.10^{-3} M osiąga minimalną wartość równą 5,45. Przy chlorowodorku dwuetyloaminy znacznie wcześniej zaczyna się szybki spadek wartości pH w kierunku kwaśnym począwszy od stężenia 5.10^{-6} M aż do 5.10^{-3} M, gdzie osiąga wartość minimalną (5,15), a następnie przy stężeniu 10^{-2} M wyraźnie wzrasta (5,95). Ogólnie widzimy, że roztwór chlorowodorku dwuetyloaminy ma charakter bardziej kwaśny przy stężeniach od 5.10^{-3} do 5.10^{-6} M w odniesieniu do CCC.

Wpływ CCC i chlorowodorku dwuetyloaminy na wielkość komórek przedstawia tabela 4 oraz ryc. 7. Pod wpływem CCC wielkość komórek *Chlorella terricola* powiększa się od $2,9\mu$ przy stężeniu 5.10^{-5} M do $3,8\mu$ przy stężeniu 10^{-2} M. *Chlorella vulgaris* o wymiarach $2,7\mu$ przy stężeniu 10^{-5} M osiąga wymiary $5,1\mu$ przy stężeniu 10^{-2} M. Jeśli chodzi o komórki *Chlorella ellipsoidea* to w kontrolnej hodowli mają wymiary $3,9\mu$, natomiast przy stężeniu 10^{-2} M osiągają wymiary $5,2\mu$.

Chlorowodorek dwuetyloaminy wpływa na wymiary komórek glonów podobnie jak CCC, tylko różnice są nieco większe.

Jak z tego wynika omawiane substancje wzrostowe powodują coraz to bardziej zwiększone wymiary glonów począwszy od stężenia 10^{-5} M, a skończywszy na stężeniu 10^{-2} M. Należy przy tym nadmienić, że obie substancje wzrostowe przy stężeniu 10^{-2} , a także częściowo przy stężeniu 5.10^{-3} M powodują zniekształcenia komórek przypominające swoim wyglądem raczej wielokąty. Na ogół są one bladzielone o dość silnie zgrubiałych błonach komórkowych (ryc. 8). Tworzą one najczęściej zgrupowania w sąsiedztwie których są komórki małe. Przy stężeniu 10^{-3} i 5.10^{-4} M komórki są nieznacznie powiększone o normalnych kształtach i zabarwieniu zielonym nawet nieco intensywniejszym w porównaniu z kontrolą.

DYSKUSJA

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że chlorowodorek dwuetyloaminy ma podobne do CCC działanie na glony z rodzaju *Chlorella*. Różnica polega tylko na tym, że działanie to jest nieco silniejsze i bardziej długotrwałe.

Aktywność biologiczną zawdzięcza prawdopodobnie grupie dwuetyloamonowej podobnie jak chlorek chlorocholiny, który jest biologicznie aktywny głównie dzięki obecności podstawowej grupy trójmetyloamonowej (Tolbert 1960). Analogia struktury chemicznej prawdopodobnie nadaje im podobne właściwości biologicznej aktywności.

Obie te substancje wzrostowe hamują tempo wzrostu glonów z rodzaju *Chlorella*, począwszy od stężenia 10^{-5} , względnie 10^{-4} M, do stężenia 10^{-2} M. Należy przy tym podkreślić, że wrażliwość poszczególnych gatunków *Chlorella* na substancje wzrostowe jest dość różnorodna, podobnie jak to ma miejsce u roślin wyższych.

Z uzyskanych wyników widzimy, że najbardziej reaguje na obecność CCC, ewentualnie chlorowodorku dwuetyloaminy *Chlorella vulgaris* i *Chl. pyrenoidosa*, nieco słabiej zaś *Chl. terricola* i *Chl. ellipsoidea*. Prawdopodobnie pewne znaczenie ma koncentracja początkowa danej kultury *Chlorella* oraz różnice w wymiarach komórek.

W naszym przypadku koncentracja początkowa hodowli *Chlorella vulgaris* była dwukrotnie większa, a *Chlorella ellipsoidea* o połowę mniejsza w porównaniu z pozostałymi dwoma gatunkami.

Omawiane substancje działają w niektórych przypadkach również stymulująco na wzrost komórek (przy stężeniu 10^{-5} — 10^{-7} M).

Podobna zależność istnieje pomiędzy zawartością chlorofilu, a stężeniem dodanej substancji wzrostowej. Począwszy od stężenia $5 \cdot 10^{-5}$ albo 10^{-4} M następuje spadek zawartości chlorofilu ściśle uzależniony od zmniejszenia się koncentracji komórek. Zwiększoną zawartość chlorofilu stwierdzano w mniejszym lub większym stopniu w granicach stężeń $5 \cdot 10^{-5}$ — 10^{-7} M, przy dużych wahaniach dla poszczególnych gatunków glonów i rodzaju substancji wzrostowej.

Wpływ CCC na zwiększenie wymiarów komórek *Chlorella* zaznacza się począwszy od stężenia 10^{-5} albo $5 \cdot 10^{-5}$ M zależnie od wrażliwości danego gatunku, a przy stężeniu substancji 10^{-2} M komórki są już silnie zniekształcone i prawie dwukrotnie większe. Chlorowodorek dwuetyloaminy działa na wymiary komórek nieco silniej niż CCC.

Biorąc pod uwagę bardziej kwaśny charakter roztworu chlorowodorku dwuetyloaminy w porównaniu do CCC, można snuć przypuszczenie, że wpływa to częściowo na większą jego aktywność biologiczną. Spadek wartości pH w roztworach chlorowodorku dwuetyloaminy w porównaniu do CCC jest prawdopodobnie uwarunkowany przejściem chlorowodoru z tego związku do pożywki Knopa w wyniku zachodzących reakcji biochemicznych w komórkach glonów.

Prof. dr Marianowi Michniewiczowi, Kierownikowi Katedry Fizjologii Roślin Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, składamy wyrazy podziękowania za przekazanie nam w darze 50 g CCC.

Jednocześnie autorzy składają wyrazy podziękowania Prof. dr Sylvestrovi Pratovi za życzliwe przesłanie próby *Chlorella ellipsoidea*.

Katedra Biologii Akademii Medycznej
w Białymstoku

SUMMARY

The influence of CCC and diethylamine hydrochloride on the growth rate, cell size and shape, and chlorophyll content was studied in *Chlorella terricola* Hollerb., *Chl. vulgaris* Beyer, *Chl. ellipsoidea* Gerneck and *Chl. pyrenoidosa* Chick.

Experiments were run in 250-ml. Erlenmeyer flasks on a modified Knop's medium at 21–24°C, under illumination of about 350 lux. The growth substances mentioned above were used in the following concentrations: 10^{-2} , 5×10^{-3} , 10^{-3} , 5×10^{-4} , 10^{-4} , 5×10^{-5} , 10^{-5} , 5×10^{-6} , 10^{-6} , 5×10^{-7} and 10^{-7} moles.

The experiments lasted 20–24 days. The cells were counted in Thom's chamber and their size was measured by a micrometrical eyepiece. Chlorophyll was determined in a photocolimeter by extraction with 86 per cent ethyl alcohol.

The studies proved that both the growth substances within the range of concentrations of 10^{-5} to 10^{-2} M (Tables 1–2 and Figs. 1–4) inhibit the growth rate of algae of genus *Chlorella*. The susceptibility of *Chlorella* species to the growth substances varied. At 10^{-5} – 10^{-7} M concentrations in some cases these substances stimulated the cell growth.

A similar dependence exists between the chlorophyll content and the concentration of the growth substance added (Table 3 and Fig. 5).

Moreover CCC and diethylamine hydrochloride increased the cell size of *Chlorella* species (Table 4 and Figs. 7–8).

LITERATURA

- Humphries E. C., 1963, Effects of (2-chloro-ethyl) -trimethylammonium chloride on plant growth, leaf area, and net assimilation rate, *Ann. Bot.* 27: 517–532.
- Linser H. und Kühn H., 1962, Lagerungshemmende bzw. standfestigkeitsstärkende Düngemittel auf Basis von gibberellinsäureantagonistischen Stoffen der Gruppe CCC (Chlorocholinchlorid), *Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde* 96: 231–247.
- Michniewicz M., 1964, Stan badań nad chlorkiem chlorocholiny (CCC) i związków pokrewnych ze szczególnym uwzględnieniem efektów i możliwości stosowania w rolnictwie, *Postępy Nauk Rol.* 6(90): 25–38.
- Michniewicz M. i Kentzer T., 1965, The increase of frost resistance of tomato plants through application of (2-chloroethyl) trimethylammonium chloride (CCC), *Experientia* 21: 230–231.
- Michniewicz M., Kentzer T., Kriesel K. and Purzycka B., 1965, The effect of (2-chloroethyl) trimethylammonium chloride on frost resistance of tomato and bean plants, *Acta Soc. Bot. Pol.* 34: 181–190.
- Pilet P. E., Supniewska H., 1961, Un effecteur de croissance des tissus végétaux. Le chlorure de triméthyl — β — chloroéthylammonium, *Bull. de la Soc. vaud, des Sc. Nature* 67: 493–500.
- Supniewska H. i Dohnal B., 1964, The effect of allyl-trimethylammonium bromide and related compounds on the growth of radish hypocotyls, *Bull. Acad. Polon. Sci. ser. sci. biol.* 12(1): 45–52.
- Tolbert N. E., 1960, (2-chloroethyl) trimethylammonium chloride and related compounds as plant growth substances. I. Chemicals structure and bioassay, *J. Biol. Chem.* 235: 475–479.
- Tolbert N. E., 1960a, (2-chloroethyl) trimethylammonium chloride and related compounds as plant growth substances. II. Effect on growth of wheat, *Plant Physiol.* 35: 380–385.
- Wittwer S. H., 1960, Eine neue Gruppe von Wuchsstoffen und einige ihrer Wirkungen auf die Pflanze im Vergleich zu denen von Auxin und Gibberellin, *Gartenbauwissenschaft*. 25: 235–248.