

Badania nad aminokwasami zasadowymi w łubinie białym w fazie intensywnej syntezy alkaloidów

Investigations on basic amino acids in white lupine at the stage of intensive
alkaloid synthesis

D. SZKLAREK

Możliwość wykorzystania łubinu jako rośliny pastewnej powstała od czasów wykrycia przez S e n g b u s c h a [52] mutantów nisko alkaloidowych. Jednakże obserwowane zagoryczenie uprawianych odmian z upływem lat skłaniało do głębszych badań nad biosyntezą i przemianami alkaloidów łubinowych.

Panujący od przeszło 50 lat pogląd [40, 54], że alkaloidy są produktami przemian aminokwasów, zyskał nie tylko poparcie [44, 46 i in.], ale nawet podano schematy możliwych reakcji chemicznych prowadzących do powstania alkaloidów łubinowych.

Zastosowanie do badań aminokwasów znakowanych ^{14}C lub ^{15}N wpłynęło znacznie na postęp w tej dziedzinie. Z badań wynika [9, 15, 17, 28], że synteza alkaloidów i ich gromadzenie pozostaje w ścisłym związku z przemianami białkowymi, przy czym większa zawartość alkaloidów w poszczególnych fazach rozwoju rośliny związana jest z większą zawartością związków białkowych [4, 5, 26]. Wymienia się obecnie kilka aminokwasów, które według szeregu hipotez bądź są, lub też mogą być prekursorami alkaloidów. I tak: fenyloalanina i tyrozyna są prekursorami hordeiny, efedryny, alkaloidów *Papaveraceae* i *Amaryllidaceae*, między innymi alkaloidów maku [1, 20, 18], tryptofan alkaloidów sporyszu i traw [12, 21, 22]; ornityna uważana jest za prekursora pierścienia pirydynowego w nikotynie u *Nicotiana tabacum* i u innych psiankowatych [11, 23] oraz łubinów [27]. Nie tylko ta ostatnia, ale i arginina, a także putrescyna mogą być prekursorami u *Datura*, *Atropa* i *Hyoscyamus* [16, 19].

Oprócz wymienionych aminokwasów w syntezie alkaloidów mogą brać udział również takie związki, jak kwas octowy (octany), nikotynowy, glutaminowy, mrówkowy, glicyna i inne.

Na temat dróg biosyntezy alkaloidów łubinowych istnieje już wiele prac [45, 41, 14, 30, 24, 48, 23]. Autorzy tych prac twierdzą, że alkaloidy

łubinowe powstają z lizyny oraz produktu jej dekarboksylacji — kadaweryny. Związki te w drodze dalszych przemian prowadzą do Δ_1 -piperydyny stanowiącej pierwsze ogniwo syntezy alkaloidów. Sparteina powstaje w wyniku kondensacji dwóch cząsteczek Δ_1 -piperydyny i jednej cząsteczki dwualdehydu glutarowego [46]. Sugerowany jest też inny schemat biosyntezy sparteiny, a mianowicie: z trzech cząsteczek lizyny lub dwóch cząsteczek lizyny i kwasu ketoaminopelimoowego [41].

Liczne badania [47, 48, 49, 50, 51, 53, 31, 32, 35, 13 i in.] oparte na zastosowaniu hipotetycznych znakowanych prekursorów wydają się potwierdzać te poglądy. Autorzy tych prac wyciągnęli wniosek, że lupinina i sparteina powstają z dwóch lub trzech cząsteczek lizyny względnie kadaweryny.

Oprócz tej hipotezy istnieje druga, w której główną uwagę poświęca się argininie. Tak na podstawie badań nad wolnymi aminokwasami w nasionach łubinów pastewnych i gorzkich [37, 38, 39] stwierdzono, że nasiona odmian pastewnych mają kilkakrotnie większą ilość wolnej argininy w stosunku do odmian gorzkich. Autorzy wyżej wymienionych prac sugerują więc możliwość udziału argininy jako prekursora w syntezie alkaloidów. Ta hipoteza, tzw. „argininowa” była również podtrzymywana w innych pracach [27, 57]. W późniejszych badaniach [34, 35] postulowano, że arginina i alkaloidy łubinowe mają wspólnego prekursora i że w przypadku gdy przekształcenie jego w alkaloidy ulega inhibicji, gromadzą się duże ilości argininy. Zahamowanie przemiany prekursora do alkaloidów [32], a zatem gromadzenie argininy (uzależnione od genów różnych dla każdego gatunku łubinu) w przypadku łubinu białego zachodzi głównie, gdy działają geny recesywne — *primus* i *tertius*.

Należy jednak wspomnieć, że w innej pracy [35], w której wprowadzono znakowaną argininę do kilkunastodniowych roślin *Lupinus angustifolius*, nie stwierdzono istotnej inkorporacji w alkaloidy.

Badania nad łubinami wąskolistnym i żółtym [6, 7], przeprowadzone metodą inną niż najczęściej stosowane, tj. pozwalającą na uniknięcie ewentualnych artefaktów, nie dostarczyły wyników, które popierałyby hipotezy dotyczące lizyny jako prekursora alkaloidów, lub też argininy jako związku mającego wspólnego prekursora z alkaloidami.

Na podstawie przedstawionych wyżej danych z literatury wynika, że w problemie biosyntezy alkaloidów nie uzyskano jeszcze jednoznacznych danych eksperymentalnych, czego dowodem jest istnienie dość sprzecznych hipotez i mimo ogromnego wkładu pracy problem ten jest wciąż jeszcze otwarty.

W niniejszej pracy nad aminokwasami zasadowymi starano się sprawdzić istniejące hipotezy metodą inną, bez ingerencji w metabolizm rośliny. Wychodząc z założenia, że genetycznie uwarunkowane różnice w zawartości alkaloidów mogą znaleźć odbicie również w zawartości lub

intensywności syntezy ich ewentualnych prekursorów, jakby to wynikało z przytoczonych wyżej hipotez, do doświadczeń użyto roślin łubinu białego: a) odmian genetycznie różnych — gorzkiej populacji miejscowej i pastewnej odmiany średniowczesnej 'Przebędowski' (forma ojowska szybko-pędnych) oraz b) dwóch biotypów szybko-pędnych pochodzących od wspólnych rodziców odmian pastewnych (jeden z nich gorzki, a drugi pastewny).

W fazie butonizacji pędów bocznych, tj. w okresie intensywnej syntezy alkaloidów, poddawano je analizie na: a) aminokwasy wolne i białkowe (po hydrolizie) ze szczególnym uwzględnieniem lizyny i argininy, b) zawartość alkaloidów, c) radioaktywność ogólną roślin, d) radioaktywność właściwą lizyny, argininy i alkaloidów.

METODYKA BADAŃ

Doświadczenie prowadzono w warunkach hali wegetacyjnej w wazonach wagnerowskich zawierających mieszaninę piasku wiślanego i gleby, w stosunku 7:2 kg; przed wysiewem zastosowano pożywkę jak w badaniach poprzednich [3]. Wschody roślin nastąpiły około 3 maja (tab. 2), a 5 maja rośliny zakażono szczepem bakterii brodawkowych (*Rhizobium lupini*) hodowli puławskiej. Rośliny podlewano wodą wodociągową utrzymując wilgotność odpowiadającą 60% pojemności wodnej podłoża. W miarę wzrostu przerywano je dwukrotnie do ośmiu w wazonie.

Dla zwiększenia intensywności syntezy alkaloidów w pędach bocznych 7 lipca usunięto strąki pędu głównego roślin. Ósmego dnia po dekapitacji, o godz. 11²⁰ rośliny reprezentujące badaną populację, umieszczono w kamerze ze szkła organicznego, znajdującej się na wolnym powietrzu. Ilość wprowadzonego CO₂ znakowanego ¹⁴C zapewniła średnią intensywność fotosyntezy około 10 mg/dm⁻²h⁻¹. Ekspozycja trwała 3 godziny. Bezpośrednio po ekspozycji dokonano sprzętu części roślin (2 × 2 rośliny z każdej populacji). Rośliny cięto na wysokości ok. 1 cm pod liścieniami, pozostałe zostawiono na 20 godz. w kamerze; dnia 17 lipca o godz. 10³⁰ dokonano drugiego zbioru. Poszczególne rośliny podzielono na pędy główne i pędy boczne, które natychmiast zamrożono w temperaturze -60°C. Materiał roślinny w stanie zamrożonym zmielono w młynku, w zbiorniku chłodzonym suchym lodem i acetonem [2]. Część materiału dodatkowo homogenizowano w szklanych homogenizatorach i poddano analizie na radioaktywność, oznaczoną na liczniku GM z okienkiem mikiowym o wydajności około 5%, przy stosowanym kącie bryłowym*; część przeznaczoną do analizy na aminokwasy i alkaloidy poddano ekstrakcji

* Radioaktywność wszystkich roztworów i eluatów oznaczano w tym samym liczniku GM.

80% alkoholem etylowym. Rozpuszczalniki oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 25—30°C. Do suchej pozostałości dodano rozcieńczonego NH_3 i ekstrahowano CHCl_3 4—5 razy; amoniakalny roztwór wodny odparowano do sucha i rozpuszczono w określonej objętości (50% etanolu). Część około 0,7 ml nanoszono na kolumny napełnione kationitem Dowex 50* (100—150 oczek) i eluowano wodą destylowaną wygotowaną, a następnie 1 N NH_4OH — eluat zagęszczono do sucha i rozpuszczono w 1 N HCl — oznaczono radioaktywność wolnych aminokwasów i ich sumaryczną zawartość, oraz część 0,8 ml nanoszono na kolumny z amberlitem C.G.-120 i dokonano rozdziału na: 1) aminokwasy kwaśne + obojętne, 2) lizynę + histydynę, 3) argininę [6].

Ilościowe oznaczenia aminokwasów wolnych i białkowych (po hydrolizie) oraz poszczególnych aminokwasów (po rozdziale) przeprowadzono na spektrofotometrze S.F. 4 [29]. Radioaktywność właściwą lizyny i argininy oznaczono z eluatów (chromatogramów) 50% alkoholu etylowego na liczniku przepływowym** (Friessecke u. Hoepner) o wydajności około 25%.

Hydrolizę skrobi i białka przeprowadzono wg Blocka i Aleksandra [8], a rozdziału hydrolizatu dokonano na kationicie Dowex 50 i amberlicie C.G.-120 [6].

Alkaloidy oznaczano ilościowo [42] przyjmując dla sumy współczynnik ekstynkcji 0,105. Dla rozdziału tych zasad stosowano bibułę chromatograficzną krążkową używając fazy n-butanol : HCl : toluen [43]. Sublimację ich przeprowadzono w próżni 10^{-3} T zbierając frakcje od 120—165° (w łubinie białym dominującym alkaloidem jest lupanina o temperaturze sublimacji 120°C, temperatura sublimacji hydroksylupaniny — 140°C, a estrów hydroksylupaniny — 165°C) i oznaczono ich ilość oraz radioaktywność na liczniku przepływowym 2 T.

WYNIKI

Przeciętny ciężar 1000 nasion wynosił u odmiany pastewnej 'Przebędowski średniowieczny' — 413 g, u gorzkiej populacji miejscowej — 455 g, u szybkopędnego: biotypu pastewnego — 380 g i gorzkiego — 406 g.

Zawartość alkaloidów i stosunki między nimi przedstawiono w tab. 1.

Chromatograficznie stwierdzono w nasionach łubinu gorzkiego sześć alkaloidów, w biotypie pastewnym pięć, a w pastewnym średniowiecznym również sześć, w tym bardzo małe ilości związku o R_f multifloryny i sparteiny, której nie wykryto w nasionach pozostałych populacji. Zawar-

* Dowex 50 i amberlit ładowano wg Truby 1954.

** Radioaktywność właściwą przeliczano z licznika przepływowego w stosunku do GM.

Tabela 1 — Table 1

Zawartość alkaloidów w nasionach badanych łubinów
Alkaloid content in seeds of investigated lupine forms

Frakcje alkaloidów o R_f Alkaloid fractions of R_f	Pastewny Przebudowski Fodder		Gorzki pop. miejscowej Bitter local population		Szybkopędny			
	suma $\mu\text{g/g}$ s. m. total $\mu\text{g/g}$ d. m.	udział pro- centowy per cent	mg/g s. m. total mg/g d. m.	udział pro- centowy per cent	biotyp pastewny fodder biotype		biotyp gorzki bitter biotype	
					$\mu\text{g/g}$ s. m. total $\mu\text{g/g}$ d. m.	udział pro- centowy per cent	mg/g s.m. total mg/g d. m.	udział pro- centowy per cent
Lupanina Lupanine	40	40	9,35	68	63	40	4,68	77
Sparteina Sparteine	0,3	0,3	—	—	—	—	—	—
13-hydroksylupanina 13-hydroksylupanine	19,5	19,5	1,64	12	43	28	0,77	12
Estry 13-HL Ester-13-hydrolupanine	35	35	0,65	4,5	37	24	0,26	4
Angustifolina Angustifoline	5	5	0,53	4	3	1,5	0,09	1
a_x -multifloryna * -multifloryne	0,07	0,07	0,94	7	13	6,5	0,23	4
a_y **	0,07	0,07	0,48	3,5	—	—	0,10	2
Razem Total	100,1	100,0	13,59	100	159	100	6,13	100

* W gorzkich formach multifloryna, w pastewnych a_x o analogicznym Rf

In bitter forms multifloryne, in fodder — a_x of analogous Rf

** a_y — alkaloid not identified, whose Rf corresponds to the Rf of lupaninic acid

Tabela 2 — Table 2

Przebieg rozwoju roślin (ilość dni po wschodach)
The course of plant development (days after sprouting)

Fazy rozwoju Stage of development	Pastewny Przebė- dowski fodder	Gorzki pop. miejscowej bitter local population	Szybkopėdny	
			biotyp pastewny fodder biotype	biotyp gorzki bitter biotype
Pełne wschody Full sprouting	4.V	3.V	4.V	5.V
Butonizacja p. gł. Formation of buds on the main shoot	41	38	44	44
Pełne kwitnienie Full flowering	46	46	51	49
Zawiazywanie strąków Pods formation	54	52	56	55

tość alkaloidów w nasionach roślin pastewnych wynosiła około 0,01% i 0,01%, zaś w nasionach roślin gorzkich 1,36 i 0,62%.

Rozwój roślin (tab. 2) gorzkiej populacji miejscowej przebiegał podobnie jak u łubinu pastewnego odmiany średniowczesnej; również szybkopėdne biotypy nie wykazywały między sobą większych różnic.

Cieężar roślin (tab. 3) był stosunkowo największy u odmiany pastewnej średniowczesnej, przy czym różnice między roślinami zbieranymi natychmiast po ekspozycji i po 20 godzinach były nieistotne.

Rośliny obu biotypów szybkopėdnych wykazały bardzo duże różnice indywidualne zarówno w cieężarze pėdu głównego, jak i pėdów bocznych. Ze wzgłėdu na to wszystkie wyniki analiz podano w przeliczeniu na 1 g świeżej masy. Stąd wszelkie rozważania nad stopniem inkorporacji ^{14}C oraz nad zawartością aminokwasów wolnych i białkowych z uwzglėdnieniem zasadowych — lizyny i argininy, a takżę i alkaloidów bėdą dotyczyły ich zawartości wzgłėdnej.

U wszystkich badanych łubinów pėdy boczne wykazywały większą aktywność fotosyntetyczną niż pėdy główne, co jest oczywiste biorąc pod uwagę fazę rozwoju roślin (tab. 4). Wzgłėdna aktywność fotosyntetyczna przeciętnie dla całej rośliny w gorzkich formach była wyższa niż w pastewnych. Różnice na korzyść form gorzkich występowały również po upływie 20 godzin od ekspozycji. Obserwowane różnice w biotypach szybkopėdnych sę chyba w dużym stopniu wynikiem wcześniejszego opadania liści z pėdów głównych u roślin pastewnych. W pozostałych dwóch populacjach obserwowane różnice na korzyść roślin gorzkich przejawiały się jedynie w pėdach bocznych i były stosunkowo niewielkie. Radio-

Weight of plants — per plant (g)

Zbiory po ekspo- zycji Sam- plings after exposure	Części roślin Plant parts	Pastewny średniowczesny Przebudowski Fodder mean-early			Gorzki populacji miejscowej Bitter local population			Szybkopędny					
		udział liści contri- bution leaves %		sucha masa dry weight	udział liści contri- bution leaves %		świeża masa fresh weight	biotyp pastewny fodder biotype		biotyp gorzki bitter biotype			
		świeża masa fresh weight	świeża masa fresh weight	sucha masa dry weight	świeża masa fresh weight	świeża masa fresh weight	sucha masa dry weight	świeża masa fresh weight	udział liści contri- bution leaves %	sucha masa dry weight	udział liści contri- bution leaves %	sucha masa dry weight	
Naty- chmiast Immedia- tely	pędy główne main shot	32,1	42	4,27	24,0	43	3,56	22,2	39	3,39	28,7	39	3,97
	pędy boczne side shots	18,9	61	1,57	16,5	62	1,54	10,2	58	1,22	14,6	60	1,85
	razem total	51,0		5,84	40,5		5,10	32,4		4,61	43,3		5,82
Po 20 godz. After 20 hrs	pędy główne main shoot	30,8		4,31	20,3		3,24	24,3		3,84	22,9		3,69
	pędy boczne side shoots	15,7		1,43	16,0		1,51	16,0		2,03	12,2		1,49
	razem total	46,5		5,74	36,3		4,75	40,3		5,87	35,1		5,18

Tabela 4 — Table 4

Radioaktywność ogólna roślin (10^3 imp./min.) w przeliczeniu na 1 g św. masy
Total radioactivity of plants (10^3 cpm) per g fresh weight

Zbiory po ekspozycji Samplings after exposure	Części roślin Plant parts	Pastewny średniowczesny Przebieadowski Fodder	Gorzki populacji miejscowej Bitter local population	Szybkopećny	
				biotyp pastewny fodder biotype	biotyp gorzki bitter biotype
Natychmiast Immediately	średnie mean total	120	147	107	147
		(6.575)*	(5.991)*	(3.478)*	(6.400)*
	pędy główne main shoot	96	105	57	111
	pędy boczne side shoots	185	210	216	220
Po 20 godz. After 20 hrs.	średnie mean total	118	140	101	135
	pędy główne main shoot	83	82	46	81
	pędy boczne side shoots	187	221	219	229

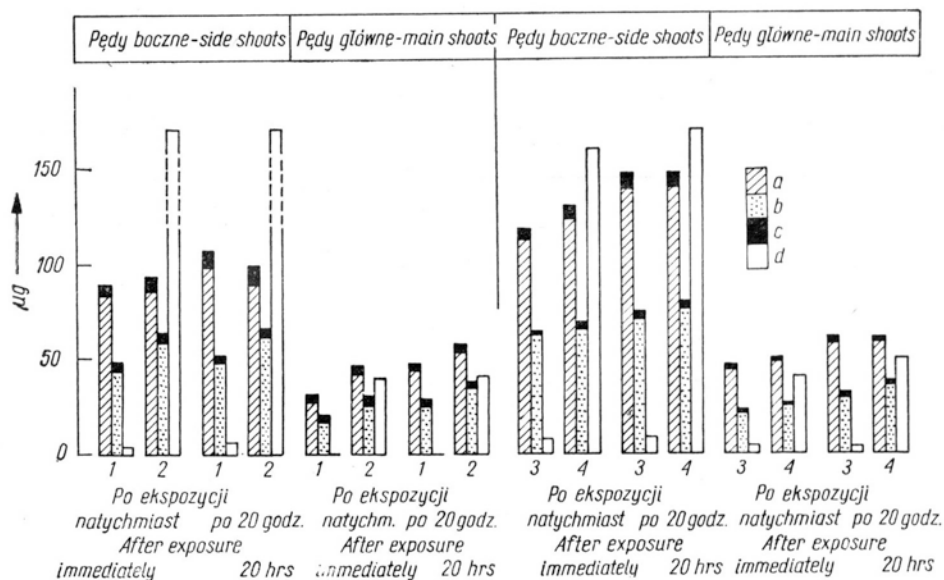
* Podano radioaktywność całej rośliny.
In brackets total radioactivity of the plant.

aktywność roślin stwierdzona po upływie 20 godzin od ekspozycji wskazuje na straty asymilatów w pędach głównych. Względna zawartość znakowanego węgla w pędach bocznych w tym czasie nie różniła się istotnie od jego zawartości bezpośrednio po ekspozycji.

Analiza aminokwasów wykazała, że względna ogólna zawartość azotu α -aminowego w pędach bocznych wszystkich roślin była wyższa niż w pędach głównych (tab. 5).

Ogólna ilość azotu α -aminowego (aminokwasów wolnych i białkowych łącznie) przeciętnie dla rośliny była wyższa u roślin gorzkich niż pastewnych. Na uwagę zasługuje fakt, że różnice te wynikały głównie z różnicy w zawartości białka. U biotypów szybkopędnych różnice na korzyść biotypu gorzkiego wystąpiły tylko w pędach bocznych, natomiast u pozostałych roślin przejawiały się zarówno w pędach bocznych, jak i głównych.

Wolne aminokwasy stanowiły 12—19% ogólnej ilości azotu α -aminowego, przy czym nie obserwowano istotnych różnic między pastewnymi



Ryc. 1. Zawartość lizyny + histydyny i arginy w μg α -amino-N w przeliczeniu na 1 g świeżej masy oraz N-alkaloidowy

1 — pastewny średniowczesny; 2 — gorzki populacji miejscowej; 3 — biotyp pastewny;
4 — biotyp gorzki
a — lizyna + histydyna białkowa; b — arginina białkowa; c — wolna lizyna lub arginina;
d — alkaloidy

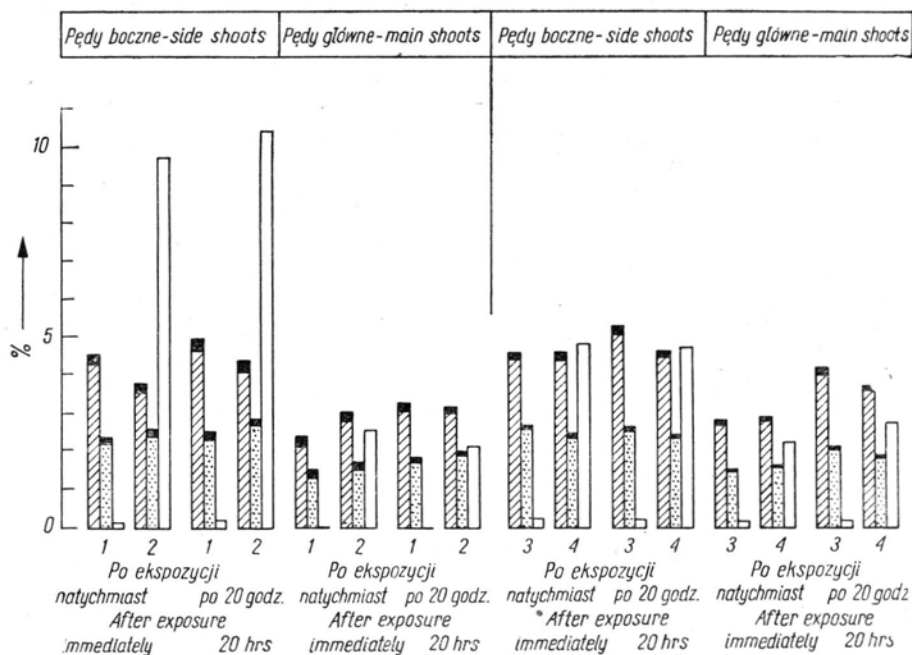
Fig. 1. Content of lysine (plus histidine), and arginine — in μg of α -amino N, and alkaloidal-N per 1 g of fresh weight

1 — fodder mean-early Przebédowski; 2 — bitter local population; 3 — fodder biotype;
4 — bitter biotype
a — protein lysine + histidine; b — protein arginine; c — free lysine or arginine;
d — alkaloids

Tabela 6 — Table 6

Zawartość wolnej i białkowej lizyny oraz argininy $\mu\text{g } \alpha\text{-amino N/g świeżej masy}$
 Content of lysine and arginine in free and bound forms — $\mu\text{g } \alpha\text{-amino N per g}$
 of fresh weight

Zbiory po ekspozycji Samplings after exposure	Części roślin Plant parts	Pastewny średniowczesny Przebudowski Fodder		Gorzki populacji miejscowej Bitter local population		Szybkopędny			
		wolna free	białkowa protein	wolna free	białkowa protein	biotyp pastewny fodder biotype		biotyp gorzki bitter biotype	
						wolna free	białkowa protein	wolna free	białkowa protein
Lizyna — Lysine	Natychmiast Immediately	4	27	4	41	3	43	2	48
		6	83	8	85	6	112	7	123
		4	48	6	59	4	67	4	74
	Po 20 godz. After 20 hours	4	43	5	53	4	57	3	58
		8	97	9	89	8	139	7	140
		5	62	6	69	5	68	5	89
Arginina — Arginine	Natychmiast Immediately	3	17	2	27	2	21	1	25
		4	44	5	58	2	62	4	65
		3	27	4	40	2	35	2	41
	Po 20 godz. After 20 hrs	3	25	3	34	3	29	2	36
		3	48	4	61	4	70	4	75
		3	34	3	45	3	46	3	51



Ryc. 2. Procentowy udział lizyny + histydyny i argininy oraz alkaloidów w sumarycznej ilości α -amino-N (wolnego i białkowego łącznie)
 1 — pastewny średniowczesny; 2 — gorzki populacji miejscowej; 3 — biotyp pastewny; 4 — biotyp gorzki
 a — lizyna + histydyna białkowa; b — arginina białkowa; c — wolna lizyna lub arginina; d — alkaloidy. Legenda jak na ryc. 1

Fig. 2. Contribution of lysine (plus histidine), arginine and alkaloids to the total α -amino N (free and bound jointly)
 1 — fodder mean-early Przebódowski; 2 — bitter local population; 3 — fodder biotype; 4 — bitter biotype
 a — protein lysine + histidine; b — protein arginine; c — free lysine or arginine; d — alkaloids. Legend as in fig. 1

a gorzkimi formami sprzątanymi zarówno natychmiast po ekspozycji, jak i po upływie 20 godzin.

W analizowanych organach wszystkich roślin ogólna ilość lizyny była większa niż ogólna zawartość argininy zarówno w przeliczeniu na jednostkę świeżej masy (tab. 6), jak i w przeliczeniu na jednostkę azotu α -aminowego (wykresy na ryc. 1 i 2). Ilość lizyny wahała się w granicach 70—90 μ g na 1 g świeżej masy, zaś ilość argininy około 35—50 μ g na 1 g świeżej masy.

Należy podkreślić, że zawartość obu zasadowych aminokwasów * była

* W hydrolizatach białkowych obok lizyny i argininy wykryto śladowe ilości histydyny, którą łączono z lizyną.

w pędach głównych wszystkich badanych łubinów znacznie niższa niż w pędach bocznych, nie tylko w stosunku do masy, ale również do ogólnej ilości azotu α -aminowego. W pędach bocznych udział lizyny w ogólnej zawartości aminokwasów wynosił około 5%, w pędach głównych w większości przypadków nie przekraczał 3—3,5%. Odpowiedni udział argininy w pędach bocznych wynosił przeciętnie 2,5%, zaś w pędach głównych był poniżej 2%.

Ilość wolnej lizyny w stosunku do ogólnej jej zawartości stanowiła przeciętnie 6—10%, a w stosunku do ilości wszystkich wolnych aminokwasów około 1,8—2,5%, udział ten był niższy niż udział lizyny w białku.

Zawartość wolnej argininy w stosunku do ogólnej jej ilości wahała się w granicach 4,5—6% u szybko-pędnych biotypów, w dwóch pozostałych populacjach stanowiła 6—10%, zaś w stosunku do wolnego azotu α -aminowego około 0,5—1,3%.

Na skutek tak małej ilości omawianych wolnych zasad błąd w oznaczeniu ilościowym jest stosunkowo duży. Stąd też obserwowanych różnic pod tym względem między formami roślin nie można uważać za istotne.

Różnice między roślinami gorzkimi i pastewnymi w zawartości białkowej lizyny w jednostce masy nie są istotne ani w pędach bocznych, ani też w pędach głównych, z wyjątkiem jednego przypadku (pęd główny natychmiast, zbiór po trzech godzinach ekspozycji — średniowczesny pastewny 'Przebędowski'), który — o ile nie wynika z błędu analizy — trudny jest do wytłumaczenia. Podobnie brak różnic między badanymi formami pod względem udziału lizyny w białku.

Zawartość białkowej lizyny w jednostce masy w szybko-pędnych biotypach była niższa niż w pozostałych formach. Różnice te wynikały głównie z większej ilości lizyny białkowej w pędach bocznych. Jednakże w przeliczeniu na jednostkę azotu α -aminowego, zawartość lizyny w szybko-pędnych nie jest większa niż w pozostałych populacjach.

Względna ilość argininy średnio dla całej rośliny (tab. 6) była nieco wyższa w łubinach pastewnych niż w gorzkich. Różnice występowały przede wszystkim w pędach bocznych. Różnic obserwowanych między biotypami szybko-pędnymi nie można uważać za istotne. Udział argininy w białku w pędach głównych jak i bocznych był jednakowy w roślinach gorzkich oraz pastewnych.

Analiza chromatograficzna alkaloidów przed sublimacją wykazała obecność frakcji o R_f sparteiny (0,86), lupaniny (100), 13-hydroksylupaniny (1,86), multifloryny — a_x (0,55), i a_y — alkaloidu nie zidentyfikowanego (w układzie butanol : HCl : toluen). W gorzkiej populacji miejscowej nie wykryto sparteiny, być może że występowała, ale w śladowych ilościach.

Ogólna zawartość alkaloidów (tab. 7) była bardzo różna nie tylko

Tabela 7 — Table 7

Zawartość alkaloidów oraz N-alkaloidowy (1 g św. masy) i % udział w N- α -aminowymContent of alkaloids per g of fresh weight and share in total α -amino-N %

	Części roślin Plant parts	Szybkopędny															
		Pastewny średnio-wczesny Przebudowski Fodder mean—early				Gorzki populacji miejscowej Bitter local population				biotyp pastewny fodder biotype				biotyp gorzki bitter biotype			
		N-alkaloido-wy alkaloidal-N		alka-loidy alka-loids μg	udział w sumie N α-ami-nowego share in total α-ami-no-N %	N-alkaloido-wy alkaloidal-N		alka-loidy alkalo-ids μg	udział w sumie N α-ami-nowego share in total α-ami-no-N %	N-alkaloido-wy alkaloidal-N		alka-loidy alkalo-ids mg	N-alkaloido-wy alkaloidal-N	udział w sumie N α-ami-nowego share in total α-ami-no-N %			
Zbiory po ekspozycji Samplings after exposure		9	1	0,06	0,41	0,04	2,60	27	3	0,18	0,40	0,04	2,28				
		35*	4	0,15	2,55	0,28	9,76	68	7	0,26	1,43	0,16	4,82				
		17	2	0,11	1,28	0,14	6,41	40	4	0,22	0,74	0,08	3,64				
Natychmiast Immediately	pędy główne main shoot	12	1	0,07	0,40	0,04	2,14	28	3	0,19	0,43	0,05	2,73				
	pędy boczne side shoots	52	6	0,21	2,52	0,28	10,45	71	8	0,23	1,56	0,17	4,73				
	średnie mean	26	3	0,14	1,33	0,14	6,37	45	6	0,22	0,85	0,09	3,67				
Po 20 godz. After 20 hrs	pędy główne main shoot																
	pędy boczne side shoots																
	średnie mean																

* Jedno powtórzenie — One repetition

w zależności od organów, ale przede wszystkim od form łubinu. Przeciętna ilość tych związków w roślinach pastewnych wahała się w granicach 0,002—0,005% świeżej masy. W roślinach gorzkich była bez porównania większa. I tak gorzka populacja miejscowa zawierała około 0,13—0,15%, natomiast biotyp gorzki szybkopędny, pochodzący z roślin pastewnych, 0,07—0,09% świeżej masy. Różnice te między roślinami gorzkimi wynikały jedynie z różnic występujących między ich pędami bocznymi. Zarówno w roślinach pastewnych, jak i gorzkich, względna zawartość alkaloidów w pędach bocznych była znacznie większa niż w pędach głównych.

Zawartość azotu alkaloidowego * w łubinach pastewnych była minimalna i przeciętna względna ilość wynosiła około 4 μg , co w przeważającej większości odpowiada ilości N- α -aminowego zawartego w wolnej lizynie.

Natomiast w roślinach gorzkich ilość azotu alkaloidowego była różna: w szybkopędnym biotypie była tylko nieco większa od ilości N- α -aminowego lizyny (białkowej i wolnej łącznie), w gorzkiej populacji miejscowej 2,5-krotnie większa (por. tab. 5, 6 i 7). Przy czym o różnicach między tymi roślinami decydowały pędy boczne. W pędach głównych zaś obu grup roślin pastewnych udział N-alkaloidowego był jednakowy (wykres na ryc. 1).

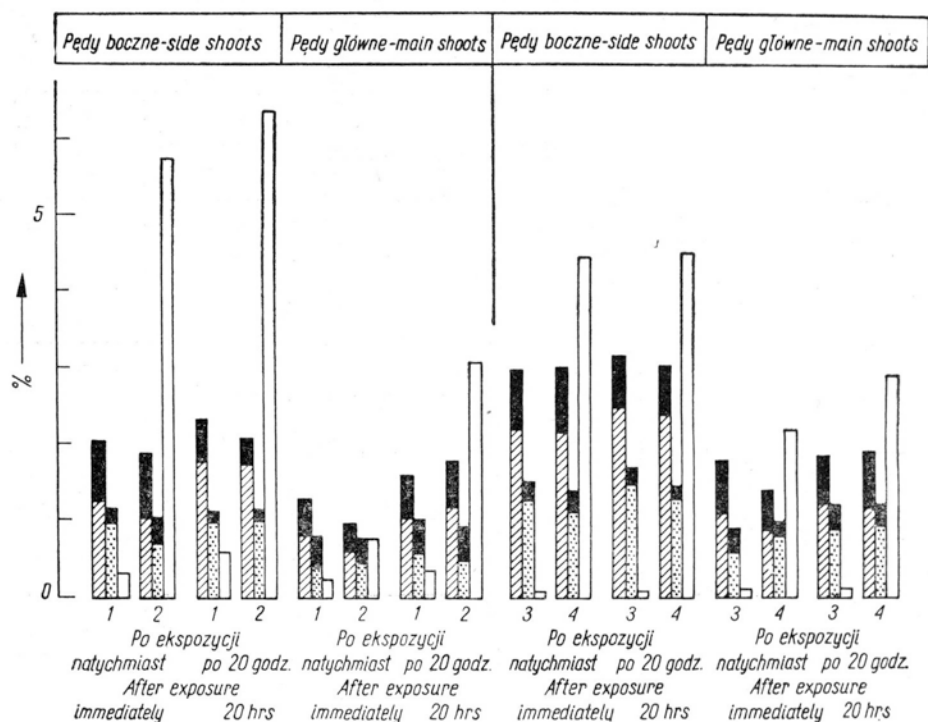
Względna wartość azotu alkaloidowego w stosunku do ogólnej ilości N- α -aminowego w roślinach pastewnych wynosiła zaledwie od 0,1—0,2%, co odpowiadało ilości wolnej argininy w stosunku do ogólnej zawartości aminokwasów.

U wszystkich badanych form przeciętny stopień inkorporacji ^{14}C w aminokwasy wolne bezpośrednio po ekspozycji (tab. 8) wynosił około 2,3—2,5%, a więc był jednakowy u gorzkich i pastewnych roślin. Natomiast stopień inkorporacji znakowanego węgla w białko, w obu gorzkich formach był większy niż w roślinach pastewnych. Na ogół u wszystkich roślin w pędach bocznych był on znacznie wyższy niż w pędach głównych. Różnice między tymi pędami występowały szczególnie wyraźnie przy uwzględnieniu radioaktywności białka w przeliczeniu na 1 g świeżej masy (tab. 8a). Po 20 godzinach od ekspozycji radioaktywność wolnych aminokwasów nie ulegała istotnym zmianom ani w pędach głównych, ani też bocznych, natomiast radioaktywność białka znacznie wzrosła. U roślin gorzkich obserwuje się nieco większą przeciętnie inkorporację ^{14}C w białko niż u roślin pastewnych; przejawiało się to zarówno w przeliczeniu w stosunku do radioaktywności ogólnej, jak też w stosunku do jednostki masy, a także w przeliczeniu na mMol.

* Biorąc pod uwagę skład jakościowy alkaloidów zawartość w nich azotu przyjęto za 11%.

Radioaktywność aminokwasów wolnych i białkowych (10^3 imp/min.)Radioactivity of free and protein amino acids (10^3cpm)

Zbiory po ekspozycji Samplings after exposure	Części roślin Plant parts	Pastewny	Gorzki populacji miejscowej Bitter local population		Szybkopędny				
		średniowczesny Przebudowski Fodder							
Radioaktywność na mMol — Radioactivity per mMol									
		wolne free	białk. protein	wolne free	białk. protein	wolne free	białk. protein	biotyp gorzki bitter biotype	
Natychmiast Immediately	pędy główne main shoot	139	56	168	55	118	26	126	35
	pędy boczne side shoots	267	92	230	91	206	75	262	83
Po 20 godz. After 20 hrs.	pędy główne main shoot	133	49	171	59	118	35	108	36
	pędy boczne side shoots	256	116	295	130	126	83	110	94
Radioaktywność na 1 g św. masy — Radioactivity per 1 g of fresh weight									
Natychmiast Immediately	pędy główne main shoot	2,01	4,27	2,28	5,75	1,20	2,70	1,54	3,30
	pędy boczne side shoots	5,64	12,70	5,58	15,39	4,44	13,52	5,30	16,76
	średnie mean	3,36	7,39	3,62	9,68	2,29	6,15	2,68	7,20
Po 20 godz. After 20 hrs.	pędy główne main shoot	2,32	4,97	1,94	7,39	1,26	3,46	1,66	3,93
	pędy boczne side shoots	5,90	17,07	5,95	19,50	4,24	17,92	5,14	24,18
	średnie mean	3,48	9,05	3,68	12,73	2,39	10,68	2,86	10,97



Ryc. 3. Procentowy udział lizyny i argininy oraz alkaloidów w radioaktywności ogólnej

1 — pastewny średniowczesny; 2 — gorzki populacji miejscowej; 3 — biotyp pastewny; 4 — biotyp gorzki
a — lizyna + histydyna białkowa; b — arginina białkowa; c — wolna lizyna lub arginina; d — alkaloidy. Legenda jak na ryc. 1

Fig. 3. Share of lysine (plus histidine), arginine and of alkaloid in total plant radioactivity (%)

1 — fodder mean-early Przebódowski; 2 — bitter local population; 3 — fodder biotype; 4 — bitter biotype
a — protein lysine + histidine; b — protein arginine; c — free lysine or arginine; d — alkaloids. Legend as in fig. 1

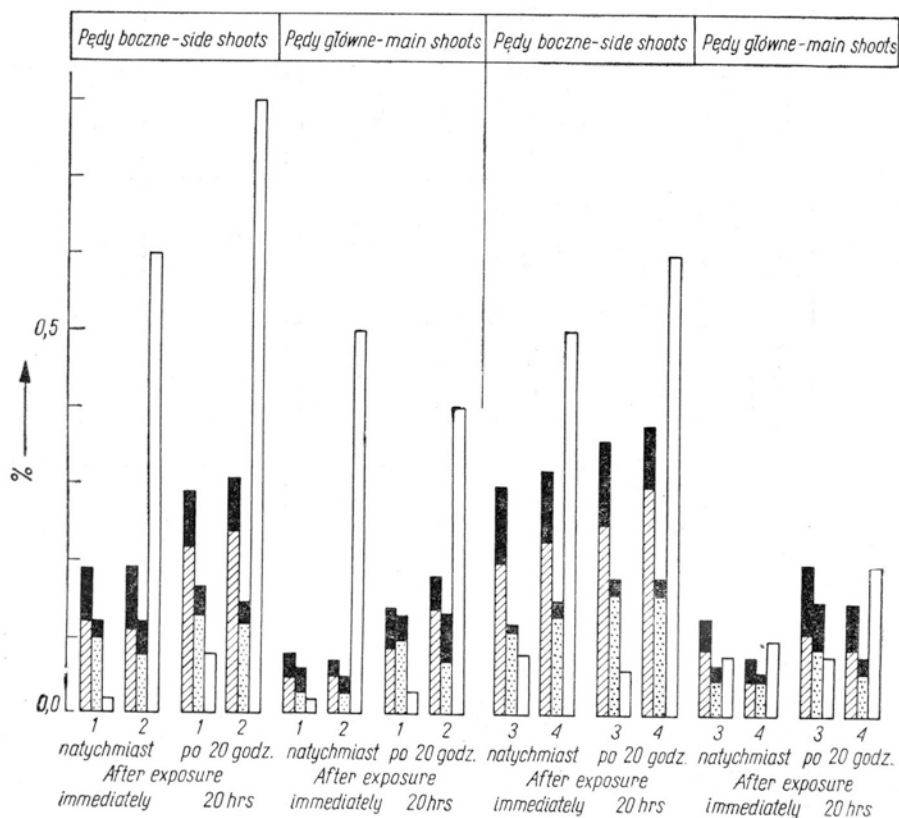
Stopień inkorporacji ^{14}C w lizynę (tab. 9) po ekspozycji był stosunkowo niewielki u wszystkich roślin i wynosił w pędach głównych ok. 1%, zaś w pędach bocznych ok. 2—2,5% radioaktywności sumy aminokwasów (wykres na ryc. 4). Obserwowanych różnic pod tym względem między roślinami pastewnymi i gorzkimi nie należy uważać za istotne. Po upływie 20 godzin od ekspozycji radioaktywność wolnej lizyny nie uległa zmianom, wzrosła natomiast, i to dość znacznie, aktywność lizyny białkowej, przy czym i w tym przypadku trudno mówić o istotnych różnicach między pastewnymi i gorzkimi roślinami.

Stopień inkorporacji ^{14}C w argininę (tab. 9) w czasie ekspozycji był niższy niż w lizynę u wszystkich badanych roślin i stanowił w pędach

Tabela 9 — Table 9

Radioaktywność wolnej i białkowej lizyny oraz argininy (10^3 imp/min)
Radioactivity of lysine and arginine in free and bound forms (10^3 cpm)

Zbiory po ekspozycji Samplings after exposure		Części roślin Plant parts	Pastewny średniowczesny Przebędowski Fodder		Gorzki populacji miejscowej Bitter local population		Szybkopędny				Pastewny średniowczesny Przebędowski Fodder		Gorzki populacji miejscowej Bitter local population		Szybkopędny			
							biotyp pastewny fodder biotype		biotyp gorzki bitter biotype						biotyp pastewny fodder biotype		biotyp gorzki bitter biotype	
			Radioaktywność na mMol Radioactivity per mMol								Radioaktywność na 1 g św. masy Radioactivity per 1 g of fresh weight							
			wolne free	białk. protein	wolne free	białk. protein	wolne free	białk. protein	wolne free	białk. protein	wolne free	białk. protein	wolne free	białk. protein	wolne free	białk. protein	wolne free	białk. protein
Lizyna — Lysine	Natychmiast Immediately	pędy główne main shoot	213	13	201	18	260	17	245	17	0,03	0,03	0,03	0,05	0,03	0,04	0,03	0,06
		pędy boczne side shoots	320	51	310	54	375	53	362	56	0,12	0,24	0,11	0,26	0,15	0,43	0,20	0,50
		średnie mean									0,06	0,11	0,08	0,13	0,09	0,16	0,09	0,20
	Po 20 godz. After 20 hrs.	pędy główne main shoot	238	33	212	30	208	24	220	25	0,05	0,08	0,07	0,08	0,05	0,06	0,06	0,05
		pędy boczne side shoots	300	110	254	131	380	69	383	90	0,13	0,47	0,14	0,49	0,22	0,65	0,22	0,68
		średnie mean									0,09	0,25	0,10	0,27	0,12	0,32	0,12	0,33
Arginina — Arginine	Natychmiast Immediately	pędy główne main shoot	171	18	125	24	103	17	177	28	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04
		pędy boczne side shoots	125	45	199	57	120	49	147	59	0,04	0,16	0,08	0,18	0,04	0,25	0,08	0,29
		średnie mean									0,03	0,08	0,05	0,09	0,03	0,10	0,05	0,13
	Po 20 godz. After 20 hrs.	pędy główne main shoot	153	28	237	29	156	36	107	32	0,03	0,04	0,04	0,08	0,03	0,07	0,04	0,09
		pędy boczne side shoots	213	81	196	95	208	73	200	86	0,04	0,26	0,04	0,28	0,04	0,37	0,04	0,47
		średnie mean									0,03	0,14	0,04	0,15	0,03	0,19	0,04	0,22



Ryc. 4. Procentowy udział lizyny + histydyny i arginy oraz alkaloidów w radioaktywności sumy N- α -aminowego

1 — pastewny średniowczesny; 2 — gorzki populacji miejscowej; 3 — biotyp pastewny; 4 — biotyp gorzki; a — lizyna + histydyna białkowa; b — arginina białkowa; c — wolna lizyna lub arginina; d — alkaloidy. Legenda* jak na ryc. 1

Fig. 4. Share of lysine (plus histidine), arginine and alkaloids in total radioactivity of amino acids (%)

1 — fodder mean-early Przebądowski; 2 — bitter local population; 3 — fodder biotype; 4 — bitter biotype

a — protein lysine + histidine; b — protein arginine; c — free lysine or arginine; d — alkaloids. Legend as in fig. 1

głównych średnio ok. 0,6—0,8%, w pędach bocznych zaś około 1,2—1,5% ogólnej radioaktywności aminokwasów (wolnych i białkowych łącznie). Nie stwierdzono przy tym żadnych istotnych różnic w radioaktywności arginy między formami gorzkimi a pastewnymi.

Radioaktywność wolnej arginy po 20 godzinach od ekspozycji nie ulegała zmianie, wzrastała natomiast jej aktywność we frakcji białkowej (i to głównie w pędach bocznych), lecz w znacznie mniejszym stopniu niż to miało miejsce u lizyny. Jednakże i tu brak istotnych różnic między odmianami gorzkimi i pastewnymi, zarówno w przeliczeniu na jednostkę

Tabela 10 — Table 10
Radioaktywność alkaloidów (10^3 imp/min.)
Radioactivity of alkaloids (10^3 cpm)

Zbiory po ekspozycji Samplings after exposure	Części roślin Plant parts	Radioaktywność na mMol Radioactivity per mMol				Radioaktywność na 1 g św. masy Radioactivity per g of fresh weight			
		Pastewny średnio wczesny Przebe- dowski Fodder	Gorzki populacji miejscowej Bitter local population	Szybkopędny		Pastewny średn. wczesny Przebe- dowski Fodder	Gorzki populacji miejscowej Bitter local population	Szybkopędny	
				biotyp pastewny Fodder biotype	biotyp gorzki Bitter biotype			biotyp pastewny fodder biotype	biotyp gorzki bitter biotype
Natychmiast Immediately	pędy główne main shoot	697	45	430	100	0,02	0,10	0,04	0,14
	pędy boczne side shoots	766*	124	800	186	0,05	1,21	0,19	1,02
	średnie mean					0,03	0,53	0,09	0,44
Po 20 godz. After 20 hrs.	pędy główne main shoot	605	154	440	105	0,03	0,29	0,06	0,20
	pędy boczne side shoots	543	157	806	220	0,15	1,62	0,23	1,33
	średnie mean					0,07	0,87	0,13	0,61

* Jedno powtórzenie
One repetition

masy, jak też w stosunku do ogólnej radioaktywności aminokwasów. Jedynie niewielkie różnice na korzyść gorzkich form wystąpiły w radioaktywnościach argininy frakcji białkowej.

Inkorporacja ^{14}C w alkaloidy (tab. 10) była różna przede wszystkim w zależności od formy genetycznej.

Stopień inkorporacji ^{14}C w alkaloidy w roślinach pastewnych był bardzo niski i wynosił średnio zaledwie 0,02—0,08% ogólnej radioaktywności (wykres na ryc. 3). Wielkość ta odpowiadała w przeważającej większości radioaktywności wolnej lizyny. Natomiast w gorzkich formach ilość włączonego w alkaloidy węgla znakowanego wynosiła w przybliżeniu około 0,5%, a więc była prawie 10-krotnie większa.

Względna przeciętna radioaktywność alkaloidów w przeliczeniu na 1 g świeżej masy była wyższa w roślinach gorzkich niż pastewnych (5—12-krotnie). Obserwowane różnice wynikały głównie (ale nie jedynie) z większego stopnia inkorporacji w pędach bocznych.

Należy zwrócić uwagę na to, że rośliny pastewne stosunkowo istotnie różniły się w stopniu inkorporacji ^{14}C w alkaloidy, niemniej jednak różnice te były bez porównania mniejsze niż różnice między gorzkimi a pastewnymi formami. Stopień inkorporacji ^{14}C w alkaloidy w pędach bocznych form gorzkich był średnio 7-krotnie większy niż w pędach głównych i znacznie przewyższał nawet obserwowany stopień u obu zasadowych aminokwasów łącznie.

Radioaktywności właściwe alkaloidów w pędach bocznych roślin gorzkich były znacznie wyższe niż radioaktywności właściwe lizyny i argininy u badanych roślin.

Na wysoką radioaktywność właściwą frakcji alkaloidów roślin pastewnych może składać się nie tylko radioaktywność zanieczyszczeń związkami niealkaloidowymi lub też kwasów organicznych wchodzących w skład estrów hydroksylupaniny.

DYSKUSJA

Jak już wspomniano we wstępie, niniejsze badania nad aminokwasami zasadowymi miały na celu sprawdzenie hipotez dotyczących ewentualnych prekursorów alkaloidów chinolizydynowych, tj. głównie lizyny i argininy, przez zastosowanie metody, która umożliwiłaby uniknięcie powstawania ewentualnych artefaktów. Do doświadczeń użyto, jak wykazały wyniki, roślin w fazie intensywnej syntezy alkaloidów, co wydawało się szczególnie celowe, gdyż wiele prac, na których oparto w większym lub mniejszym stopniu hipotezy dotyczące prekursorów, prowadzone były albo na kiełkujących nasionach [33], albo na łodygach — organach, które słabo syntetyzują alkaloidy, lub też na kilkunastodnio-

wych roślinach [25], a wreszcie na nasionach w stanie spoczynku [37, 56].

Stopień inkorporacji asymilowanego węgla w alkaloidy w pędach bocznych, szczególnie jeśli go porównać ze stopniem inkorporacji ^{14}C w białko lub tylko aminokwasy zasadowe w roślinach gorzkich był bardzo wysoki. Warto zaznaczyć, że i w roślinach pastewnych względna intensywność syntezy alkaloidów była również większa w pędach bocznych niż w pędzie głównym.

Wyniki wyraźnie wykazały, że u wszystkich badanych form udział aminokwasów zasadowych w ogólnej zawartości N- α -aminowego był w pędach bocznych wyższy niż w pędach głównych. Jednakże trudno ten fakt w jakiś sposób łączyć ze sprawą syntezy alkaloidów, ponieważ mógł być on również wynikiem niejednakowego stosunku ciężaru liści do łodyg w pędach bocznych w porównaniu z głównym, a brak jakichkolwiek danych co do składu białka tych różnych organów.

Przeprowadzone badania wykazały, że formy gorzkie i pastewne w badanej fazie rozwoju niezależnie od stopnia oddalenia genetycznego różniły się między sobą przeciętną aktywnością fotosyntetyczną (mierzona asymilacją znakowanego CO_2) oraz zawartością azotu α -aminowego na korzyść roślin gorzkich. Również i stopień inkorporacji ^{14}C w aminokwasy, szczególnie białkowe, był wyższy w gorzkich roślinach. Podobne zresztą zjawisko stwierdzono u dekapitowanych roślin łubinu wąskolistnego [6], w mniejszym stopniu łubinu żółtego [7].

W obu odmianach zarówno we frakcji wolnej, jak i białkowej we wszystkich organach, podobnie jak u wyżej cytowanych łubinów, oraz niedekapitowanych roślin łubinu żółtego [58], w przeciwieństwie do poglądu Wiewiórowskiego i Reifera [57] dominującym aminokwasem okazała się lizyna. Warto podkreślić, że udział tak lizyny, jak i argininy w ogólnej zawartości azotu α -aminowego był niemalże identyczny jak u wszystkich wymienionych wyżej gatunków (oczywiście w granicach błędu doświadczeń).

Rozpatrzmy sprawę obu zasad jako ewentualnych prekursorów alkaloidów. Jeśliby prekursorem miała być lizyna, jak na to wskazuje wielu badaczy, to mogłyby wystąpić następujące ewentualności:

1. Większa intensywność syntezy lizyny w roślinach gorzkich niż w pastewnych, na tyle większa, że wystarcza jej na taką samą ilość lizyny w białku jak u roślin pastewnych i jednocześnie na tworzenie alkaloidów. Wtedy czynnikiem decydującym przy jednakowej zawartości lizyny w obu formach powinny być różnice w radioaktywności właściwej wolnej lizyny; jak wynika ze stopnia inkorporacji ^{14}C w alkaloidy roślin gorzkich różnice te powinny być bardzo duże — niestety różnic istotnych nie obserwowano.

2. Intensywność syntezy lizyny u obu form taka sama, co może prowadzić do różnic w zawartości lizyny w białku o odwrotnym charakterze niż różnice w zawartości alkaloidów. Tego też nie obserwowano; zawartości lizyny były w zasadzie jednakowe.

3. Poprzednia możliwość zakładała u obu form jednakowy stopień przemiany lizyny w związki niealkaloidowe. Można jednak wysunąć trzecią możliwość, a mianowicie: synteza u obu form i stopień inkorporacji w białko jednakowe; u jednych jednak z części lizyny tworzą się alkaloidy, u innych związki niealkaloidowe — taka możliwość może istnieć i niniejsze badania nie są w stanie do niej się ustosunkować.

Należy również zastrzec się, że określenia radioaktywności właściwej dotyczyły ekstraktu z całego organu, a więc dawały obraz jakiejś określonej średniej. Niestety nic nie można powiedzieć o radioaktywności właściwej lizyny i alkaloidów w miejscach syntezy tych ostatnich w komórce. Ta sprawa nie może być wyjaśniona przy obecnym poziomie techniki badawczej, niemniej jednak należy i ją mieć na uwadze.

Jeśli przyjąć, że arginina i alkaloidy mają wspólnego prekursora, oraz tezy zwolenników tej hipotezy, to uzyskane wyniki dały odpowiedź wyraźnie negatywną, albowiem w organach intensywnej syntezy alkaloidów, a mianowicie w pędach bocznych zawartości tej zasady, jak i jej radioaktywności właściwe były jednakowe w roślinach gorzkich i pastewnych.

Warto podkreślić, że zgodność wyników między dwiema parami form roślin (gorzki + pastewny) wskazuje, iż czynniki genetyczne nie związane z syntezą lub przemianami alkaloidów, nie mają istotnego wpływu na badane w niniejszej pracy wskaźniki. Stąd też doświadczenia tego typu mogą być prowadzone również na odległych od siebie genetycznie odmianach gorzkich i pastewnych.

WNIOSKI

Badania nad populacją gorzką, pastewną odmianą średniowieczną oraz dwoma biotypami szybko-pędnymi o wspólnym pochodzeniu (gorzkim i pastewnym), przeprowadzone w fazie intensywnej syntezy alkaloidów, pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Przeciętna aktywność fotosyntetyczna, określona stopniem inkorporacji znakowanego dwutlenku węgla, była wyższa w formach gorzkich.

2. Zawartość azotu α -aminowego (wolnego i białkowego łącznie) w przeliczeniu na 1 g świeżej masy była większa u roślin gorzkich, niezależnie od stopnia zbliżenia genetycznego niż u roślin pastewnych. Różnice między obiema formami wynikały głównie z większej zawartości azotu białkowego w pędach bocznych. Rośliny gorzkie i pastewne

wykazywały zbliżoną zawartość wolnych aminokwasów. Przeciętny stopień inkorporacji znakowanego węgla w te aminokwasy był również u obu form jednakowy.

Stopień inkorporacji znakowanego węgla w białko w obu gorzkich odmianach był większy niż w roślinach pastewnych. Względna radioaktywność białka w pędach bocznych wszystkich roślin w przeliczeniu na 1 g świeżej masy była wyraźnie wyższa niż w pędach głównych.

3. We wszystkich badanych organach zarówno form gorzkich, jak i pastewnych lizyna była dominującym ilościowo aminokwasem zasadowym. Zawartość lizyny wolnej była znikoma (1,8—2,5% ogólnej ilości wolnych aminokwasów), a w stosunku do ogólnej jej ilości przeciętnie wahała się w granicach 6—10%. Zawartość lizyny we frakcji wolnej i białkowej łącznie była wyższa w pędach bocznych niż w pędach głównych. Formy gorzkie i pastewne zarówno w pędach bocznych, jak i głównych nie wykazywały żadnych istotnych różnic ani pod względem zawartości lizyny, ani też jej radioaktywności ogólnej lub właściwej.

4. Wolna arginina w stosunku do ogólnej zawartości wolnych aminokwasów stanowiła zaledwie około 0,5—1,3%, w stosunku do ogólnej jej ilości wahała się w granicach 4,5—6% u biotypów szybko-pędnych, w dwóch pozostałych populacjach 6—10%. Udział argininy (wolnej i białkowej łącznie) w pędach bocznych był wyższy niż w pędach głównych. Rośliny gorzkie i pastewne nie różniły się istotnie ani pod względem zawartości argininy, ani też jej radioaktywności ogólnej czy też właściwej.

5. Przeciętna zawartość alkaloidów w roślinach pastewnych wahała się w granicach 0,002—0,005% świeżej masy, w gorzkich zaś była znacznie większa i stanowiła w populacji miejscowej 0,13—0,15%, a w biotypie szybko-pędnym pochodzącym z rodziców pastewnych 0,07—0,09% świeżej masy. Zarówno w roślinach pastewnych, jak i gorzkich względna zawartość alkaloidów była wyższa w pędach bocznych niż głównych.

6. Przeciętny stopień inkorporacji ^{14}C w alkaloidy u roślin pastewnych był niski i wahał się w granicach od 0,02—0,08% ogólnej radioaktywności, równał się więc zaledwie udziałowi wolnej lizyny w tej aktywności. W formach gorzkich zaś wynosił około 0,5%. Stopień inkorporacji ^{14}C w alkaloidy w pędach bocznych obu odmian gorzkich był średnio siedmiokrotnie większy niż w pędach głównych i około 2—2,5-krotnie przewyższał stopień obserwowany u obu zasadowych aminokwasów łącznie. Radioaktywność właściwa alkaloidów w pędach bocznych form gorzkich była znacznie wyższa niż radioaktywność właściwa lizyny i argininy u badanych roślin.

7. Jednakowe zachowanie się roślin pastewnych i gorzkich pod względem zawartości lizyny, intensywności jej syntezy, jak i radioaktywności właściwej, w szczególności jej formy wolnej, nie dostarcza

argumentów popierających hipotezę, wg której lizyna mogłaby być prekursorem alkaloidów.

Jeśli zaś chodzi o hipotezę, wg której arginina i alkaloidy miałyby wspólnego prekursora, to uzyskane dane dały odpowiedź wyraźnie negatywną.

Składam serdeczne podziękowanie prof. dr H. Bireckiej za cenne wskazówki i krytyczne uwagi udzielane mi w czasie wykonywania doświadczeń oraz opracowywania wyników.

*Pracownia Przemiany Materii
Zakładu Fizjologii Roślin PAN
Warszawa, ul. Rakowiecka 8*

(Wpłynęło 4 lipca 1968 r.)

SUMMARY

The data obtained in experiments with 2 pairs of bitter and fodder biotypes allow to draw the following conclusions:

1. The bitter and fodder forms did not differ significantly from each other as regards the rate of growth and development. However, according to the degree of ^{14}C labelled CO_2 fixation at the stage under investigation the mean photosynthetic activity of bitter plants was higher than that of the fodder ones.

2. The relative content of free and bound amino acids jointly was in bitter forms higher independently of the degree of genetical proximity. This fact was due mainly to differences in the side shoots. In both forms the content of free amino acids varied between 13 and 19% of their total. The degree of ^{14}C incorporation into them was also similar. On the other hand, the degree of ^{14}C incorporation into protein in bitter biotypes was higher than that in fodder ones.

3. In all parts of the bitter as well as fodder plants lysine was the quantitatively dominating basic amino acid. The amount of free lysine accounted for about 6–10% of its total. The total content of lysine constituted in side shoots 5 and in the main shoots about 3% of total amino acids.

No significant differences between the fodder and bitter forms were observed either in the content, or in the specific and total radioactivity of lysine. The amount of free arginine ranged between 4.5–10% of its total. Like in the case of lysine, no differences were observed between the investigated plants either in the content or specific and total radioactivity of this amino acid.

4. The relative alkaloid content was in bitter plants 20–30 times higher than in the fodder ones. In both forms the side shoots contained much more alkaloids than the main ones. The degree of ^{14}C incorporation into alkaloids in fodder plants was very low and reached only the degree observed in free lysine. In bitter plants it was ten times higher. The degree of ^{14}C incorporation into alkaloids in side shoots of both bitter forms was seven times higher than in their main shoots and exceeded the degree of ^{14}C incorporation into basic amino acids by 2–2.5 times. The specific radioactivity of alkaloids in side shoots of bitter plants was much higher than that of their lysine and arginine.

5. The similar behaviour of bitter and fodder plants as regards lysine, the rate of its synthesis and the specific activity, especially of its free form do not

supply arguments supporting the hypothesis according to which lysine might be the precursor of lupine alkaloids. As regards the hypothesis concerning the common precursor of arginine and alkaloids, the data obtained allow to give a negative answer.

LITERATURA

1. Battersby A. W., Harper B. J., 1962, J. Chem. Soc. 3534.
2. Birecka H., 1963, Acta Soc. Bot. Pol., 32: 131.
3. Birecka H., Mazan A., Szklarek D., 1959, Acta Soc. Bot. Pol. 28:285.
4. Birecka H., Szymańska W., Scibor-Marchocka A., 1960, ibidem 29:275.
5. Birecka H., Szklarek D., Mazan A., 1960, Bull. Acad. Pol. Sci., ser. sci. biol. 8:175.
6. Birecka H., Nalborczyk E., 1966, Acta Soc. Bot. Pol. 35:129.
7. Birecka H., Głazewski St., Nalborczyk T., 1966, Bull. Acad. Pol. Sci., ser. sci. biol. 14:15.
8. Block R. J., Aleksander P., 1963, Analiticheskiye metody w bielkowej chimii.
9. Dawson R. F., 1948, Advances in Enzymology 8:203.
10. Dawson R. F., 1956, J. Am. Chem. Soc. 78:11.
11. Dawson R. F., 1958, ibidem 80:196.
12. Gröger D., Stolle K., Mothes K., 1964, Tetrahedron Letters 2579.
13. Hasse K., 1965, Internation. Symp. Bioch. u. Physiol. der Alkaloide, Halle (Saale) 187.
14. Hegnauer M. R., 1959, Pharm. Tijdschr. 3:35.
15. Henry T. R., 1949, The Plants Alkaloids, London.
16. James W. C., 1946, Nature 158:654.
17. James W. C., 1950, The Alkaloids, vol. I. Manske R. H. P., Holmes H. L. New York.
18. Kleinschmidt G., Mothes K., 1959, Zschr. Naturforsch. 146:52.
19. Kączkowski J., Marion L., 1963, Canad. J. Chem. 41:2651.
20. Leete E., Marion L., 1955, J. Biol. Chem. 214:71.
21. Leete E., 1961, Tetrahedron 14:35.
22. Leete E., 1964, Tetrahedron Letters 1619.
23. Leete E., 1967, Annual Review of Plant Physiol. 18:179.
24. Luckner M., 1964, Die Pharm. 19:9.
25. Mazuś B., Reifer I., 1964, Bull. Acad. Pol. Sci., ser. sci. biol. 12:297.
26. Mironieńko A. W., 1962, Wiesti Akad. Nauk SSSR nr 1:38.
27. Mironieńko A. W., 1965, Fizjologia i Biochimia Lupina, Mińsk.
28. Mironieńko A. W., Kazanowicz J. N., 1956, Bull. Inst. Bioch. AN BSSR 2:157.
29. Moore S., Stein W. H., 1948, J. Biol. Chem. 176:367.
30. Mothes K., Schütte H. R., 1963, Angewandte Chem. 75:256.
31. Nowacki E., 1963, Genetica Polonica 4:161.
32. Nowacki E., 1964, ibidem 5:189.
33. Nowacki E., Przybylska J., Hurrich J., 1960, Bull. Acad. Pol. Sci., ser. sci. biol. 8:445.
34. Nowacki E., Przybylska J., 1962, ibidem 10:1.
35. Nowacki E., Byerrum R., 1962, Bioch. Bioph. Res. Comm. 7:58.

36. Nowacki E., Byerrum R., Kazimierski T., Nowacka D., 1965, Internation. Symp. Bioch. u. Physiol. der Alkaloide, Halle (Saale) 205.
37. Przybylska J., 1959, Bull. Acad. Pol. Sci., ser. sci. biol. 7:505.
38. Przybylska J., 1960, Genetica Polonica 1:145.
39. Przybylska J., Hurrich J., 1962, ibidem 3:87.
40. Robinson R., 1917, J. Chem. Soc. III, nr 699.
41. Robinson R., 1955, The Structural relations of natural products Oxford.
42. Reifer I., Niziołek S., 1957, Acta Bioch. Pol. 4:165.
43. Reifer I., Przeździecka J., Kleczkowska D., 1959, ibidem 6:17.
44. Schöpf Cl., 1940, Uspiechy chemii 9:10.
45. Schöpf Cl., 1949, Angewandte Chemie 61:31.
46. Schöpf Cl., 1951, ibidem 69:69.
47. Schütte H. R., 1960, Arch. die Pharm. 293:1006.
48. Schütte H. R., 1965, Internation. Symp. Bioch. u. Physiol. der Alkaloide, Halle (Saale) 199.
49. Schütte H. R., Nowacki E., Schafer Ch., 1960, Arch. Pharm. 295:20.
50. Schütte H. R., Bohlman F., Reusche W., 1961, Arch. f. Pharm. 294:610.
51. Schütte H. R., Hindorf H. Z., Mothes K., Hubner G., 1964, Liebigs. Ann. Chem. 680:93.
52. Sengbusch R. 1942, Landwirtschaftliche Jahrbücher, t. 91: 724.
53. Souček M., Schütte H. R., 1962, Angewandte Chemie 74:901.
54. Trier G., 1912, Über einfache Pflanzenbasen und Ihre Besichungen Aufbau der Eiweisstoffe Begr. Berntrage, Berlin, 117.
55. Turba F., 1954, Chromatographische Methoden in der Protein Chemie.
56. Wiewiórowski M., Augustyniak J., Skrzypińska H., Przybylska J., Kociałkowski Z., 1959, Acta Bioch. Pol. 6:143.
57. Wiewiórowski M., Reifer I., 1961, Bull. Acad. Pol. Sci., ser. sci. biol. 9:441.
58. Zebrowska J., 1967, Praca doktorska, Warszawa SGGW.