Badania składu chemicznego pyłku

II. Badania błon pyłkowych

Investigation on the chemical composition of pollen

II. The study of the pollen membranes

A. KWIATKOWSKI i K. LUBLINER-MIANOWSKA

Niezniszczalność błon pyłków i zarodników, zachowujących się w stanie rozpoznawalnym w ciągu tysiącleci w osadach geologicznych uwarunkowana jest ich składem chemicznym. Zagadnienie chemizmu błon pyłkowych budziło zainteresowanie chemików i palynologów, a chociaż nie jest ono świeżej daty, niewiele gatunków pyłku roślinnego poznano pod tym względem. W pracy naszej chcieliśmy w miarę możliwości rozszerzyć i uzupełnić listę gatunków pyłku zbadanych dotychczas pod względem chemizmu błon pyłkowych. Już badacze z początku XIX wieku, jak np. John (1814) czy Braconnot (1829), stwierdzili niewrażliwość substancji wysycającej błony pyłku na czynniki chemiczne. Nie wchodząc w charakter chemiczny substancji, nazwali ją „polleniną“. Berzelius (1837) w swym podręczniku zwraca również uwagę na wielką odporność błon pyłku na działanie zasad, podkreślając jednocześnie, iż błony te są palne. Zetsche i Huggler (1928) przytaczają opinie Tschirscha i Czapka stwierdzających, iż pollenina posiada pewne podobieństwo do błon skutynizowanych.

Botanicy, jak Biourge (1892) i Szaferowa (1928) w swych pracach nad pyłkiem nie używają terminu „pollenina“, aczkolwiek podkreślają szczególny charakter błon pyłkowych. Biourge opisuje odporność egzyny ziarn pyłku na działanie rozpuszczalników i uważa, iż jest ona skutynizowaną błoną. Szaferowa obserwując działanie wodorotlenku potasu, kwasu chromowego, kwasu siarkowego i wody Javella na pyłek stwierdziła, iż zewnętrzne warstwy egzyny są odporniejsze na czynniki chemiczne od błon skutynizowanych, jak również wykazują one różnice w barwieniu.

FIZYKO-CHEMICZNE WŁASNOŚCI SPOROPOLLENINY

Zbadanie charakteru chemicznego polleniny zawdzięczać należy szwajcarskiej szkole F. Zetsche'go. Badania trwające ponad 10 lat zapoczątkowała praca Zetsche'go i Hugglera (1928). Autorzy badając zarodniki widłaka wyizolowali substancję wysycającą błony, określili jej własności fizyczne i część własności chemicznych. Substancję tę nazwali „sporoniną“. Wobec dużego podobieństwa fizycznego do polleniny, w dalszych pracach szkoły Zetsche'go używany jest wspólny termin „sporopolleniny“, określający związki wysycające zewnętrzną błonę pyłku czy zarodników.

Bardzo charakterystyczną cechą sporopolleniny jest jej odporność na czynniki chemiczne. Nie działają na nią rozpuszczalniki organiczne, jest bardzo odporna na zasady i kwasy nieutleniające. Mniejszą odporność wykazuje ona na czynniki utleniające: stężony kwas azotowy, kwas chromowy, a nawet nadmanganian potasu powodują powolny rozkład z wytworzeniem kwasu szczawiowego, dwutlenku węgla i ciekłych produktów utlenienia.

Duża odporność sporopolleniny na czynniki chemiczne pozwoliła na wyodrębnienie jej z materiałów kopalnych, np. z węgla kamiennego, brunatnego oraz z torfu. Marcusson (1918) stwierdził, iż dymiący kwas azotowy szybko rozpuszcza związki humusowe, co zezwoliło na wzbogacanie preparatów w znacznie wolniej atakowaną sporopolleninę. Ilościowe oznaczenie sporopolleniny stało się możliwe jednak dopiero po stwierdzeniu przez Zetsche'go i Hugglera (1928), iż po zbromowaniu jest ona przez pewien czas niemal całkowicie odporna na działanie dymiącego kwasu azotowego, podczas gdy związki humusowe zachowują się podobnie jak niebromowane. Bromowana sporopollenina pod wpływem kwasu azotowego ulega jednoczesnemu utlenianiu i nitracji, tak że zachodzą równocześnie procesy zmniejszające i zwiększające masę (wagę) badanego ciała, w wyniku czego ustala się równowaga pozwalająca — przy zachowaniu podobnych warunków — prowadzić prace ilościowe. Stan równowagi ustala się po 14 godzinach od dodania dymiącego kwasu azotowego do zbromowanej sporopolleniny i trwa do 20 godzin, po czym rozpoczyna się powolny, trwający około 4 tygodni okres rozkładu sporopolleniny na związki rozpuszczalne.

Interesująca jest również duża odporność sporopolleniny na działanie temperatury. Zetsche i Kaelin (1932b, 1932c) wykazali, iż dopiero powyżej 180°C — bez zmian fizycznych — wydziela się z niej woda. Powyżej 300°C rozpoczyna się widoczny rozkład termiczny sporopolleniny, prowadzący w 340—360°C do przekształcenia jej w smolistą masę.

Zbromowana sporopollenina, zmieniona przez utlenienie czy nitrację, jest związkiem chemicznie bardzo nietrwałym. Przy ogrzewaniu rozkłada

się, tak że suszenie należy przeprowadzać w temperaturze pokojowej. Zasady, jak amoniak, ługi, pirydyna itp., częściowo rozpuszczają ją, zmieniając barwę pozostałości na brunatną i prowadzą do odłączenia się bromu.

Prowadząc analizę elementarną czystej sporopolleniny widłaka stwierdzono (Zetsche i Hugger, 1928), że stosunek atomów C : H wynosi 1 : 1,6, a więc jest taki sam, jak w terpenach. W skład cząsteczki sporopolleniny wchodzi jednak jeszcze tlen, tak że cząsteczka elementarna posiadałaby wzór $(C_{10}H_{16}O_3)_x$. Późniejsze badania Zetsche'go i Vicari (1931) oraz Kalta (1938), oparte na zbadaniu pyłku większej liczby gatunków, pozwoliły na skorygowanie poprzednich wyników. Okazało się, iż stosunek atomów C : H jest zmienny, zależnie od gatunku rośliny; również ilość tlenu nie jest stała. Z uwagi na konieczność lepszego odzwierciedlenia stosunków ilościowych poszczególnych atomów w sporopolleninie, przyjęto za Zetsche i Vicari (1931) odnosić wyniki analizy elementarnej do C_{90} .

Badając produkty utlenienia sporopolleniny ozonem Zetsche i Hugger (1928) znaleźli grupę $\begin{array}{c} \diagup \\ -C- \\ \diagdown \end{array} CH_3$ występującą w drobinie sporopolleniny co najmniej 4 razy, oraz stwierdzili, iż tlen występuje głównie w grupach hydroksylowych, w małych ilościach tworząc również mostki eterowe. Kalt (1938) wzmiankuje, że w produktach ozonizacji znajdują się człony kwasu bursztynowego. Ogólnie biorąc, utlenianie sporopolleniny ozonem prowadzi do utworzenia produktów podobnych do ozonizowanego kauczuku, co wskazywałoby na podobieństwo sporopolleniny do polimerów izoprenu. Badania Zetsche'go i współpracowników pozwoliły na stwierdzenie, że sporopollenina zbudowana jest z wielu ciał heterogenicznych o podobnej budowie, nie dały jednak wyczerpującej odpowiedzi na postawione zagadnienie składu chemicznego.

Pochodzenie sporopolleniny w organizmie roślinnym nie jest jeszcze wyjaśnione. Przypuszcza się, iż jest ona wytworem polimeryzacji terpenów, aczkolwiek nie wyklucza się udziału białek, celulozy itp. Sporopollenina występuje jedynie w błonach pyłku i zarodników; w innych częściach roślin jej nie znaleziono.

CEL I METODA PRACY

Dotychczasowe badania zawartości sporopolleniny w błonach pyłkowych dotyczyły stosunkowo niewielkiej liczby gatunków, a przy tym nie wyłącznie tych, które są ważne dla analizy pyłkowej.

Z całej listy drzew stanowiących naszą florę leśną, w spektrach pyłkowych notowane są stale pyłki następujących rodzajów: *Picea*, *Abies* i *Pinus* z *Gymnospermae*, oraz *Salix*, *Corylus*, *Alnus*, *Betula*, *Carpinus*, *Ulmus*, *Fagus*, *Tilia* i *Quercus* z *Angiospermae*. Z tych 12 rodzajów dotąd

stwierdzono zawartość sporopolleniny tylko w błonach *Pinus*, *Picea* i *Corylus*. Pozostałe gatunki nie zostały objęte badaniami szkoły *Zetsego*, który użył pyłków roślin nie mających większego znaczenia dla analizy pyłkowej osadów czwartorzędowych, jak np. *Phoenix*, *Ceratozamia*.

W naszych badaniach chcieliśmy określić, czy i w jakim stopniu ilość sporopolleniny w błonach pyłku warunkuje jego zachowanie się w osadach geologicznych. Analiza pyłkowa nie ujawnia pyłku rodzajów *Fraxinus*, *Acer* i *Populus*, a przeważnie również *Larix*, *Juniperus* i *Taxus*. Dążeniem naszym było zatem zebranie materiału pyłkowego z gatunków notowanych i nie notowanych w spektrach pyłkowych i stwierdzenie w nich zawartości sporopolleniny. Trudności jednak związane ze zdobyciem większych ilości materiału spowodowały zmiany w liście badanych gatunków. Praca nasza składała się z dwu odrębnych części: zbioru pyłku i jego analizy chemicznej.

Zbiór i przygotowanie materiału

Zbiór czystego pyłku sprawia wiele trudności, co niewątpliwie jest przyczyną niedostatecznego wciąż zbadania jego składu chemicznego. Podczas wytrząsania z kwiatostanów pyłek ulega zanieczyszczeniu kurzem oraz fragmentami tkanek roślinnych, jak nitki pręcikowe, ścianki pylników itp., tak że zebrany materiał jest częstokroć niejednorodną mieszaniną ciał o różnym charakterze, ciężarze i własnościach. Stopień czystości surowca zależy od gatunku rośliny oraz w dużym stopniu od sposobu zbierania.

Celem otrzymania materiału wyjściowego odpowiedniego do badań chemicznych, należy pyłek (zarodniki) oczyścić. Większych zanieczyszczeń pozbywamy się odsiewając pyłek przez siatkę planktonową. Dalsze oczyszczanie opiera się na metodach sedymentacyjnych (*Zetse*, 1932) i wymaga dużej ilości pyłku i odczynników. Przesiany materiał zalewa się alkoholem, miesza i pozostawia w spokoju przez pewien czas. Pyłek osiada na dnie naczynia, zaś płyn z zawiesiną zanieczyszczeń (fragmenty tkanek) ostrożnie się dekantuje. Po kilkakrotnym powtórzeniu tej operacji pyłek suszymy na powietrzu lub w eksykatorze, nad chlorkiem wapnia. Dla usunięcia cięższych od pyłku zanieczyszczeń mineralnych, surowiec zalewa się w krystalizatorze chloroformem lub czterochlorkiem węgla tak, aby wypływający na powierzchnię płynu kożuch pyłku tworzył warstwę grubości najwyżej 4 mm. Co pewien czas kożuch porusza się pałeczką szklaną dbając by nie zmacić cząstek mineralnych osadzających się na dnie naczynia. Po kilkakrotnym przemieszaniu zbiera się ostrożnie pyłek i po zalaniu świeżym rozpuszczalnikiem powtarza operację kilkakrotnie. Kontrolę czystości prowadzi się pod mikroskopem (100—200 x) pozwalającym wykryć cząstki pyłu, obiektywnie zaś można badać czystość przez oznaczenie popiołu.

Zetsche i Hugler (1928) oraz Kalt (1938), którzy oczyszczali w ten sposób zarodniki widłaka (produkt handlowy) doszli do zawartości 0,9% popiołu; praktycznie ich preparaty zawierały nieco ponad 1% części mineralnych. Użyte przez nas zarodniki widłaka przed oczyszczeniem zawierały 1,23% popiołu, po oczyszczeniu zaś 1,16% i poniżej tej granicy nie udało się nam zejść.

Tak przygotowany materiał zawiera jeszcze pewną ilość fragmentów komórek itp. drobnych części, które jako cięższe od alkoholu a lżejsze od chloroformu nie oddzieliły się od pyłku. Dla ich oddzielenia zalewa się materiał ponownie chloroformem (może być użyty poprzednio i odsączony) i dodaje stopniowo absolutnego alkoholu tak, by zanieczyszczenia opadły na dno, a pyłek pozostał w warstwie górnej. Następnie materiał suszy się nad chlorkiem wapnia lub nad pięciotlenkiem fosforu aż do uzyskania stałej wagi. Suszenie w suszarce jest niewskazane z uwagi na obecność olejków eterycznych, które w podwyższonej temperaturze ułatwiają się z pyłku, zniekształcając wyniki.

Oczyszczenie pyłku wyżej podaną metodą wymaga posiadania większej jego ilości (co najmniej 10 g). Ponieważ rozporządzaliśmy taką ilością pyłku tylko dla sześciu rodzajów, przeprowadziliśmy próbne analizy na materiale surowym i oczyszczanym, aby przekonać się, czy jest możliwe oznaczenie sporopolleniny w materiale nie oczyszczanym sedymentacyjnie.

Oznaczanie sporopolleniny i celulozy

Oznaczenie to wykonuje się przez kolejne usunięcie związków mniej odpornych na działanie czynników chemicznych. Następujące po sobie czynności powodują: rozkład ciał białkowych i zmydlenie tłuszczów i wosków (działanie roztworem wodorotlenku potasu), rozpuszczenie tłuszczów i olejków (przemywanie eterem, ekstrakcja alkoholem), wymycie węglowodanów prócz celulozy (stężony ług, woda), tak iż w końcu pozostają tylko ciała odporne na wymieniony zespół czynników chemicznych: sporopollenina i celuloza. Celulozę określa się pośrednio, przez hydrolizę kwasową części odpornej na zmydlenie i ekstrakcję. Metoda ma charakter analizy konwencjonalnej, to jest prowadzi do otrzymania ciała odpornego na określone czynniki chemiczne stosowane w określonych warunkach temperatury, kolejności i czasu działania. Zmiana któregośkolwiek parametru prowadzić może do otrzymania wyników nieporównywalnych, co jest m. in. charakterystyczną cechą analiz konwencjonalnych, stosowanych często do oznaczania ciał niecałkowicie zdefiniowanych pod względem chemicznym.

Zastosowana przez nas metoda oznaczania sporopolleniny i celulozy jest zmodyfikowanym nieco postępowaniem Zetschego i Huggera.

lera (1928) oraz Kalta (1938). Różnice polegają na tym, że autorzy ci nie używali alkoholowego roztworu KOH do początkowego zmydlenia. Dalej, dla uniknięcia pienienia, zakwaszali oni alkaliczne roztwory przed sączeniem. Użycie alkoholowego roztworu wodorotlenku potasu ma na celu lepsze zmydlenie substancji zapasowych występujących w pyłku i dzięki tej modyfikacji uzyskiwaliśmy wyniki bardziej powtarzalne. Zakwaszenie nie jest konieczne, gdyż pienienia można uniknąć przez sączenie do dużej kolby ssawkowej, na której dnie jest kwas. Dla uniknięcia strat w wypadku nadmiernej skłonności do tworzenia piany, między kolbę ssawkową a pompę próżniową można zamontować flaszkę Wulfa. W naszym wypadku przesącz nie był potrzebny, ewentualne więc straty płynu przy pienieniu były bez znaczenia. Zauważyliśmy natomiast, że po zakwaszeniu alkalicznego roztworu utrudnione jest sączenie, gdyż tygiel Schotta zatyka się wytrąconą zawiesiną i dopiero po dłuższym płukaniu odmywa się.

Naważkę 1500 mg pyłku zalewa się 30 ml wodnego roztworu 10% wodorotlenku potasu i pod chłodnicą zwrotną gotuje się przez 5 godzin. Następnie sączy się przez tygiel Schotta 1 G3, zalewa 5% alkoholowym roztworem KOH (również ok. 30 ml) i gotuje przez dalsze 3 godziny. W dalszym ciągu należy materiał odsączyć przez ten sam tygiel, przemyć ok. 100 ml gorącej wody destylowanej i następnie wygotować dwukrotnie z wodą i dwukrotnie z alkoholem. Ponieważ woda lepiej wymywa resztki ługu, a niektóre gatunki pyłku w alkoholu pęcznieją i przyklejają się do ścian naczynia, wskazane jest — w razie potrzeby — piąte wygotowanie z wodą (jak zawsze, destylowaną). Między tymi operacjami sączy się pyłek przez ten sam tygiel, a po ostatnim sączeniu przemywa się wodą aż do zaniku śladów ługu, na co wystarcza ok. 800 ml. Po wymyciu wodą zalewa się pyłek w tyglu alkoholem i pozwala wyciec bez używania pompy próżniowej, co trwa nieraz kilka godzin. Następnie materiał zalewa się eterem i również bez użycia pompy próżniowej pozostawia do obcieknięcia. W końcu wstawia się tygiel do suszarki i suszy w temp. 105°C do stałej wagi. Z uwagi na bezpieczeństwo wskazane jest, by tygiel po zalaniu eterem dokładnie wysechł, np. przez pozostawienie w temperaturze pokojowej na noc.

Otrzymany w ten sposób materiał jest sporopolleniną łącznie z celulozą. Dla otrzymania czystej sporopolleniny hydrolizuje się celulozę 85% kwasem fosforowym, przy czym Kalt (1938) używał do tego celu również 42% kwasu solnego.

Badany materiał przenosi się ilościowo z tygla do zlewki na 100 ml, zalewa 30 ml 85% kwasu fosforowego i przez 10 dni prowadzi się hydrolizę w temperaturze pokojowej, możliwie często mieszając zawartość zlewki. Po ukończonej hydrolizie sporopolleninę odsąca się (najlepiej przez ten sam co uprzednio tygiel Schotta), przemywa rozcieńczonym kwasem fosforowym, a w końcu wodą destylowaną. W dalszym ciągu gotuje się sporopolleninę kilkakrotnie z wodą, płucze w końcu litrem gorącej wody destylowanej. W celu wykończenia postępowania — jak poprzednio — do tygla nalewa się alkoholu i eteru, po czym suszy w 105°C. Pozostałość jest czystą sporopolleniną.

Podczas przygotowywania preparatu sporopolleniny ważne jest, by w trakcie wielu operacji nie „zgubić“ części materiału łatwo przylegają-

cego do ścian naczyń. Dalej należy uważać, by otrzymana sporopollenina + celuloza, oraz czysta sporopollenina były sypkie, nie zbite w grudki. W tym celu preparat przed suszeniem należy dobrze wymieszać z eterem i pozwolić na swobodne odcieknięcie. Zbrylony materiał hydrolizuje się trudno i nie ilościowo, źle się odmywa i daje wyniki rozbieżne zarówno w celulozie, jak i sporopolleninie.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Jak wspomniano wyżej, oczyszczenie zebranego pyłku wymaga znaczniejszych ilości materiału, którego zbiór jest bardzo żmudny. Dla stwierdzenia jak dalece tracimy na dokładności stosując badanie pyłku jedynie odsiewanego, przeprowadziliśmy analizy na zawartość celulozy i sporopolleniny w materiale oczyszczanym sedymentacyjnie i nie oczyszczanym. Badania dokonano na sześciu gatunkach: *Lycopodium clavatum*, *Alnus incana*, *Populus alba*, *Tilia* sp., *Pinus silvestris* i *Larix europaea*.

Z tabeli 1 wynika, że w materiale nie oczyszczonym otrzymujemy nieco wyższą zawartość popiołu, co jest zrozumiałe z uwagi na obecność cząstek pyłu. Na wyniki dotyczące zawartości sporopolleniny nie ma wpływu oczyszczanie, natomiast przy zawartości celulozy widzimy większą niezgodność wyników w materiale nie oczyszczanym). W obu wypadkach (materiał oczyszczany i nie oczyszczany) wykonaliśmy po 4 lub 5 oznaczeń dla każdego rodzaju z tym, że oznaczenia najbardziej odbiegające były odrzucane i braliśmy jako wynik średnią z trzech najbliższych sobie cyfr. Postępowanie to jest konieczne z uwagi na straty w czasie poszczególnych operacji, zbrylanie się materiału itp.

Wyniki odniesione są — podobnie jak w całej pracy — do materiału bezwodnego.

Z tabeli 1 widzimy, iż mieliśmy do dyspozycji dostatecznie czysty materiał wyjściowy. Wielokrotna sedymentacja doprowadziła do nieznacznego jedynie obniżenia popielności, tak że błąd wynikający z operowania materiałem nie oczyszczonym byłby nikły. Wyjątkowo duża zawartość popiołu, wykazująca zanieczyszczenia mineralne w pyłku lipy, pochodzi stąd, że materiał ten nie był zbierany bezpośrednio z kwiatostanów, ale stanowił odsiany miał z handlowego kwiatu lipowego. Obserwując wyniki oznaczeń celulozy widzimy, że w wypadku materiału surowego mamy zarówno wyższe wyniki średnie (wyjątkiem jest widłak), jak i znaczne wahania między poszczególnymi próbami.

Ponieważ nie dysponowaliśmy dostatecznie dużą ilością materiału wyjściowego dla wszystkich rodzajów pyłku, a przy tym wyniki doty-

T a b e l a 1

Zawartość popiołu, celulozy i sporopolleniny w materiale pyłkowym a) nie oczyszczonym b) oczyszczonym
 Ash, cellulose and sporopollenine content in pollen and spores a) raw, b) purified

	Popiół Ash				Celuloza Cellulose						Sporopollenina Sporopollenine					
	a		b		I	II	III	Średnia Mean value			I	II	III	Średnia Mean value		
	a	b	a	b	a	b	a	a	b	a	b	a	b	a	b	a
<i>Lycopodium clavatum</i>	1,23	1,16	3,1	2,9	2,6	2,6	2,7	2,6	2,8	2,7	23,6	23,2	23,9	23,6	23,1	23,5
<i>Alnus incana</i>	3,42	3,36	2,6	1,7	5,1	1,9	2,4	1,8	3,3	1,8	8,9	8,3	9,2	8,9	8,6	8,8
<i>Pinus silvestris</i>	3,07	2,83	5,8	3,4	6,1	3,9	4,0	3,5	5,3	3,6	20,1	19,5	19,3	19,5	19,4	19,6
<i>Larix europaea</i>	3,25	3,21	6,0	4,0	4,2	4,1	4,0	4,1	4,7	4,1	5,4	5,6	5,4	5,2	5,6	5,4
<i>Populus alba</i>	7,8	5,2	4,2	4,3	4,2	4,2	4,2	4,3	4,2	4,2	4,9	4,9	4,9	5,1	5,0	5,0
<i>Tilia</i> sp.	38,5	7,6	9,4	8,1	9,4	8,2	—	—	9,4	8,1	14,4	14,8	14,6	14,9	—	14,5

T a b e l a 2

Zawartość celulozy i sporopolleniny w pyłku i zarodnikach
Cellulose and sporopollenine contents in pollen and spores

Nazwa rośliny The plants name	badania własne own investig.		badania poprzedników former investigations		autor
	celuloza	sporo- pollenina	celuloza	sporo- pollenina	
	%	%	%	%	
1. <i>Polytrichum commune</i>	2,2				
2. <i>Lycopodium clavatum</i>	2,7	23,4	2,3	23,8	Zetsche
3. <i>Equisetum arvense</i>	14,1	1,8			
4. <i>Onoclea struthiopteris</i>	1,2	8,2			
5. <i>Ceratozamia mexicana</i>				20,1	Kalt
6. <i>Pinus silvestris</i>	3,6	19,6	2,0	21,9	Kalt
7. <i>Pinus uliginosa</i>	8,5	18,1			
8. <i>Pinus mughus</i>	9,7	17,3			
9. <i>Picea orientalis</i>			2,2	20,0	Zetsche
10. <i>Picea omorica</i>			2,2	20,9	Zetsche
11. <i>Picea excelsa</i>			1,8	19,4	Kalt
12. <i>Taxus baccata</i>				6,3	Kalt
13. <i>Larix europaea</i>	4,1	5,4			
14. <i>Phoenix dactylifera</i>				15,8	Kalt
15. <i>Secale cereale</i>			0,3	4,4	Kalt
16. <i>Typha angustifolia</i>	5,3	11,3			
17. <i>Corylus avellana</i>	2,7	8,5	1,2	8,3	Zetsche
18. <i>Alnus incana</i>	1,8	8,8			
19. <i>Betula verrucosa</i>	3,2	8,2			
20. <i>Carpinus betulus</i>	3,5	8,2			
21. <i>Ulmus sp.</i>	5,8	7,5			
22. <i>Quercus rubra</i>	2,6	5,9			
23. <i>Quercus sessiliflora</i>	1,9	5,9			
24. <i>Populus alba</i>	4,2	5,05			
25. <i>Papaver sp.</i>			0,6	5,0	Zetsche
26. <i>Acer negundo</i>	2,4	7,4			
27. <i>Sambucus nigra</i>	1,7	12,2			
28. <i>Tilia sp.</i>	8,1	14,9			

czące zawartości sporopolleniny były dla nas najważniejsze, zdecydowaliśmy się na oznaczenia celulozy i sporopolleniny w materiale nie oczyszczanym sedymentacyjnie. Oznaczenia dokonywane były, zależnie od ilości posiadanego surowca, trzy lub więcej razy. Jako wynik celulozy braliśmy wynik najniższy, uważając iż materiał wyjściowy może być zanieczyszczony przypadkowymi wtrąceniami fragmentów tkanek i podobnym materiałem celulozowym. Wynik sporopolleniny jest średnią co najmniej 3 wyników. Otrzymane wyniki zestawione są w tabeli 2.

DYSKUSJA WYNIKÓW

W pracy niniejszej wykonano oznaczenia celulozy i sporopolleniny ogółem w 20 rodzajach pyłku lub zarodników, z czego 17 rodzajów badano po raz pierwszy, a trzy analizy (*Pinus silvestris*, *Corylus avellana* i *Lycopodium clavatum*) były powtórzeniem analiz szkoły Z e t s c h e g o. Z listy gatunków zbadanych przez nas, w spektrach pyłkowych osadów geologicznych notowanych jest stale 9 rodzajów: *Corylus*, *Pinus silvestris*, *Picea excelsa*, *Alnus*, *Betula*, *Carpinus*, *Ulmus*, *Tilia* i *Quercus sessiliflora*, pyłek zaś *Larix*, *Populus*, *Pinus mughus* i *Pinus uliginosa* może również występować w osadach czwartorzędowych. Pozostałe rodzaje pyłku nie mają znaczenia dla analizy pyłkowej i mają dla nas jedynie wartość porównawczą. Wyniki analiz zawarte w tabeli 2 przedstawione są łącznie z wynikami analiz Z e t s c h e g o i jego współpracowników, co daje nam ogólny przegląd zawartości sporopolleniny w 28 rodzajach pyłku i zarodników. Porównanie wyników Z e t s c h e g o i naszych dla wspomnianych trzech gatunków było dla nas zarazem sprawdzianem dokładności metody. Jak widać, najmniej zgodne są wyniki dotyczące *Pinus silvestris*. Być może, że gatunek ten jest bardziej czuły na różnice warunków klimatycznych. Procent sporopolleniny w błonach pyłku tych rodzajów, które konserwują się dobrze w osadach torfowych, wykazuje dużą rozpiętość. Około 20% sporopolleniny zawiera pyłek *Pinus* i *Picea*, 14,9 pyłek *Tilia*, około 8% pyłek *Corylus*, *Alnus*, *Betula* i *Carpinus*. Jeszcze mniej zawiera jej *Ulmus* (7,5%) i *Quercus* (5,9%). *Larix*, którego pyłek przeważnie nie bywa notowany w spektrach pyłkowych, posiada zbliżoną do *Quercus* zawartość sporopolleniny (5,4%). Nietrwałość tego pyłku tłumaczyć może jego cechy morfologiczne. Duże (70 μ średnicy) kuliste, cienkościenne ziarna pyłku mogą łatwo ulegać pęknięciu lub zgnieceniu. Pyłek *Larix* i pyłek *Populus* w porównaniu z innymi, trwalszymi rodzajami pyłku, mają błony w mniejszym stopniu wysyczone sporopolleniną, co się da wyrazić stosunkiem procentowym sporopolleniny do całej masy błon (sporopollenina + celuloza). Zależność ta u *Larix* wyraża się cyfrą 57%, u *Populus* 53%, u *Tilia* 66%, u *Pinus* 84%, u *Alnus* 83%. Nie wprowadzamy tej zależności dla innych rodzajów pyłku, które przed oznaczeniem celulozy nie były oczyszczone sedymentacyjnie od fragmentów tkanek. W materiale pyłkowym oczyszczanym tylko przez odsianie, oznaczenie celulozy obarczone jest zbyt znacznym błędem.

Dotychczasowe wyniki pozwalają na stwierdzenie, że zawartość około 5% sporopolleniny może być wystarczająca dla zachowania pyłku w osadach torfowych tylko przy dostatecznym stopniu wysycenia błony. Konserwacja pyłku w osadach jest wynikiem chemicznych cech sporopolleniny, która w beztlenowych warunkach sedymentacji nie jest narażona

na najbardziej naruszający jej strukturę czynnik, jakim jest utlenianie.

Oznaczenie ilości sporopolleniny w błonach pyłku i zarodników ma dla botaniki jeszcze jedno znaczenie. Zetsche (1928) stwierdza, że uderzająca jest różnica w ilości sporopolleniny między *Gymnospermae* a *Angiospermae*, z których ostatnie zawierają znacznie mniej tej substancji w błonach pyłku. Z uwagi na to, że w rozwoju ewolucyjnym roślin zarodniki (mikrospory) tracą stopniowo swój przetrwalnikowy charakter i jako ziarna pyłkowe rozwijają się w krótkim czasie po wypyleniu — stopniowe zmniejszanie się ilości sporopolleniny u nagonasiennych w porównaniu z zarodnikowymi, a następnie u okrytonasiennych w porównaniu z nagonasiennymi wydawało się bardzo prawdopodobne.

Niemniej, jak się okazało, wnioski tego rodzaju opierać należy na większej ilości danych. Szereg: *Lycopodium* 23,8%, *Ceratozamia* 20,1%, *Picea* 20,0%, *Corylus* 8,3%, *Secale* 4,4% mógł zwrócić uwagę na stopniowe zmniejszanie się ilości sporopolleniny w miarę rozwoju ewolucyjnego. Zagadnienie jednak zaciemnia się, jeżeli dodamy nowe wyniki do poprzednich. Zarodniki *Polytrichum commune* zawierają tak mało sporopolleniny i celulozy razem (2,2%), że nie udało się w analizie chemicznej oddzielić od siebie obu składników błony. Ciekawym byłoby stwierdzenie ilości sporopolleniny w zarodnikach *Sphagnum*, które są tak wybitnie trwałe w osadach torfowych. W szeregu zarodnikowych *Equisetum arvense* zawiera wybitnie mało sporopolleniny (1,8%). Być może, zwiększenie stosunkowe ilości celulozy przypisać tu należy budowie zarodnika. Paproć, *Onoclea Struthiopteris* ma ilość sporopolleniny bliższą *Angiospermae* niż *Lycopodiaceae*. Zawartość sporopolleniny u *Larix* (5,4%) i *Taxus* (6,3%) nie wykazuje podobieństwa do innych *Gymnospermae*. Widać z tego, że dalsze badania mogą dostarczyć innych jeszcze niespodziewanych wyników. Wydaje się zatem, że utrata przetrwalnikowego charakteru zarodników mogła się dokonywać swoiście w różnych gromadach państwa roślinnego. Z badań nad analizą elementarną zarodników *Pteridophyta* i pyłku *Angiospermae*, prowadzonych przez Sosa-Bourdouil (1938) wynika również fakt, że zarodniki odznaczają się większą niż pyłek zmiennością składu chemicznego. Brana tu była pod uwagę zawartość azotu, węgla i wodoru. Przeciętnie jednak zarodniki wykazują większą zawartość węgla (50—65% C) niż pyłek (48—53% C). Jest to wynik badań przeprowadzonych na kilkunastu gatunkach *Pteridophyta* i przedstawicielach 10 rodzin *Angiospermae* (Sosa-Bourdouil 1938, 1939, 1949, 1954).

Stałość składu chemicznego pyłku dotyczy raczej mniejszych jednostek systematycznych, potwierdzając istniejące wśród nich pokrewieństwa biochemiczne. W badaniach Bourdouil dotyczy to nie tylko

wyników analizy elementarnej, ale również i zawartości białek. W naszych badaniach natomiast widzimy zawartość sporopolleniny bliską siebie dla przedstawicieli rodziny *Betulaceae* i rodzaju *Pinus* oraz zupełną zgodność obu gatunków *Quercus*.

STRESZCZENIE

Celem pracy jest zwiększenie liczby gatunków pyłku zbadanych na zawartość sporopolleniny. Szczególnie zwraca się uwagę na pyłek drzew, notowany w spektrach pyłkowych osadów geologicznych. Metoda oznaczania sporopolleniny jest nieco zmodyfikowaną metodą Zetsche i Hugglera (1928) i polega na kolejnym rozpuszczeniu składników pyłku z pozostawieniem celulozy i sporopolleniny jako nierozpuszczalnych, a następnie na oddzieleniu celulozy drogą hydrolizy kwasowej.

Na sześciu gatunkach pyłku i zarodników zbadano możliwość oznaczania sporopolleniny na materiale nie oczyszczonym sedymentacyjnie, a tylko odsiewanym. Stwierdzono, że oczyszczanie sedymentacyjne ma wpływ na zawartość celulozy i popiołu, lecz nie wpływa na zawartość sporopolleniny (tabela 1).

Wyniki analiz zestawione są w tabeli nr 2, łącznie z wynikami poprzedników. Powtórnie zanalizowano pyłek *Pinus silvestris*, *Corylus avellana* i zarodniki *Lycopodium clavatum*. Po raz pierwszy oznaczono zawartość sporopolleniny w zarodnikach 1 gatunku mchu i 2 gatunków *Pteridophyta* oraz w pyłku 3 gatunków *Gymnospermae* i 11 gatunków *Angiospermae*.

Stwierdzono, że dla zachowania się pyłku w osadach ważną jest nie tylko zawartość sporopolleniny w odniesieniu do suchej masy pyłku, ale i stopień wysycenia błon, czyli stosunek ilościowy sporopolleniny do masy błon pyłkowych.

Katedra Botaniki

i

(Wpłynęło dn. 21.1.1957 r.)

Kat. Techn. Chem. DREWNA i TORFU

Politechniki Gdańskiej

SUMMARY

The object of this work was to enlarge the list of pollen and spores species investigated on account of sporopollenine content. Especially we pay attention to pollen of trees noted in pollen spectra of geological sediments. The method of determination of sporopollenine is a modified method of Zetsche & Huggler (1928). By successive dissolving of pollen compounds there remains cellulose and sporopollenine. Further the cellulose is being dissolved by acid hydrolysis.

There were explored six species of pollen and spores in regard of sporopollenine determination possibility from the raw material (non purified by the sedimentation processes). We have confirmed that the sedimentation purification of pollen raw material has no influence on the

sporopollenine quantity, but only on the quantity of the cellulose and ash (table 1).

In the table 2 there are given the results of our own analyses and of previous workers in this subject. The analyses of pollen of *Pinus silvestris* and *Corylus avellana* and of the spores of *Lycopodium clavatum* were repeated once more. The sporopollenine contents in the spores of 1 species of moss, 2 species of *Pteridophyta*, 3 species of *Gymnospermae* and 11 species of *Angiospermae* were given here for the first time.

There was found that the stability of pollen in geological sediments is not only dependent on the sporopollenine content, but the degree of saturation of the pollen membranes (the quantitative relation of sporopollenine to the mass of pollen membranes) is also important.

LITERATURA

- Berzelius N., 1837, Lehrbuch, 3 Aufl. cyt. wg Kalta.
- Biourge P., 1892, Recherches morphologiques et chimiques sur les grains de pollen, La cellule 8.
- Braconnot H., 1829, Recherches chimiques sur le pollen du *Typha latifolia*, Ann. Chim. Phys. 42.
- Czapek K., 1925, Biochemie der Pflanzen.
- Jentys-Szaferowa J., 1928, Budowa błon pyłku leszczyny, woskownicy i brzoź europejskich, oraz ich rozpoznawanie w stanie kopalnym, Rozprawy Wyd. Mat. Przyr. PAU, 18 Ser. B (5).
- John P., 1814, Schweigg. Journ. 12, cyt. wg Kalta.
- Kaelin O., 1933, Rezente und fossile Sporopollenine, Inaugural-dissertation Bern, Wyd. Biel 1945.
- Kalt P., 1938, Untersuchungen von Sporopolleninen und andere pflanzlichen Membransubstanzen, Inaugural-dissertation, Wyd. Biel. 1945.
- Marcusson J., 1918, Chemiker Ztg, 42: 437, również J. Soc. Chem. Ind. 38, 98A.
- Sosa-Bourdouil C. 1938, Sur la composition comparée des spores et des pollens des plantes vasculaires, C. R. Hebd. d. S. d. l'Ac. d. Sc., 206.
- Sosa-Bourdouil C., 1939, Composition des spores de quelques fougères, Bull. Mus. Nat. d'Hist. Nat. 11 (2, 3).
- Sosa-Bourdouil C., 1949, Sur la biochimie comparée des pollens et des spores des plantes vasculaires, Bull. de la Soc. Chim. Biol. 31.
- Sosa-Bourdouil C., 1954, Composition chimique des pollens et systematique, VIII Congr. Int. de Bot. Sect. 6, 251.
- Vicari H., 1936, Untersuchungen über die Membranen rezenter und fossiler Sporen und Pollen, Inaugural-dissertation, Bern.
- Zetsche F., 1928, Chemische Grundlagen der Pollenanalyse, Mitteil. Naturf. Ges. Bern, 28.
- Zetsche F., 1932, „Kork und Kutikularsubstanzen“ i „Fossile Pflanzenstoffe“ w podręczniku: Klein G. „Handbuch der Pflanzenanalyse“, Wien.
- Zetsche F., Huggler K., 1928, Untersuchungen über die Membran der Sporen und Pollen. I. *Lycopodium clavatum*, Lieb. Ann. 461: 89.
- Zetsche F., Kaelin O., 1931, Zur Autoxydation der Sporopollenine, Helv. Chim. Acta 14: 517.

- Zetsche F., Kaelin O., 1932, Quantitative Bestimmung des Polymer-Bitumens (Sporopollenine, Cutine, polym. Harze usw.) der Braun- und Steinkohlen, *Helv. Chim. Acta* 15: 412.
- Zetsche K., Kaelin O., 1932b, Das thermische Verhalten der Sporopollenine, *Helv. Chim. Acta* 15: 670.
- Zetsche F., Kaelin O., 1932c, Die Inkohlungstemperatur der Steinkohlen, *Helv. Chim. Acta* 15: 675.
- Zetsche F., Vicari H., 1931, Untersuchungen über die Membran der Sporen und Pollen, *Helv. Chim. Acta* 14: 58.
- Zetsche F., Vicari H., Schärer G., 1931, Fossile Sporopollenine, *Helv. Chim. Acta* 14: 67.