Przemiany sparteiny w łubinie białym (*Lupinus albus*)

Część I. Łubin biały pastewny

Changes of sparteine in white lupine (Lupinus albus)

Part I. White sweet lupine

H. BIRECKA, T. SEBYLA, E. NALBORCZYK

W związku z szeregiem hipotez (Hegnauer 1955, Van der Kuy 1956, Woker 1956), według których pewne alkaloidy łubinowe, jak lupanina, hydroksylupanina oraz lupinina mogą powstawać w roślinie wskutek przekształcania się sparteiny, już w doświadczeniach przeprowadzonych w roku 1956 zwróciliśmy szczególną uwagę na tę ostatnią zasadę azotową. Jednakże próby wprowadzenia jej do roślin poprzez korzenie ze środowiska niesterylnego nie dały pozytywnych wyników. Dlatego też w latach 1957 i 1958 wróciliśmy do tego zagadnienia zmieniając sposób wprowadzenia sparteiny do roślin.

W międzyczasie ukazały się prace E. Nowackiego nad tym zagadnieniem (1958 a i b). Autor ten wprowadzając w różny sposób m.in. sparteinę do form słodkich *Lupinus albus*, *mutabilis*, *angustifolius* i *luteus* stwierdza, iż alkaloid ten ulega przemianie głównie na lupaninę, przy czym w zależności od gatunku po upływie jednego, kilku lub kilkunastu dni. Jednakże cytowany autor nie podaje w swych pracach żadnych danych eksperymentalnych pozwalających na ocenę charakteru przemian sparteiny jak i innych alkaloidów pod względem ilościowym w czasie trwania doświadczenia.

Przedmiotem naszych badań był wyłącznie łubin biały. W niniejszej pracy podajemy wyniki dotyczące jednej z jego form pastewnych.

METODYKA DOŚWIADCZEŃ

Do badań użyto łubinu białego pastewnego średniowczesnego hodowli prof. Barbackiego.

Doświadczenie pierwsze prowadzono w wazonach wagnerowskich w warunkach hali wegetacyjnej. Zastosowane podłoże oraz pożywka były analogiczne jak w doświadczeniu nad dynamiką alkaloidów w czasie ontogenezy badanego łubinu

(Birecka, Mazan, Szklarek 1959), z tą tylko różnicą, że chlorek wapnia zastąpiono siarczanem wapnia w dawce 1 g na wazon. Nasiona wysiano 18.IV.1957 r. zakażając odpowiednim szczepem bakterii. Po przerywce pozostawiono po 7 roślin w wazonie. Rośliny podlewano wodą wodociągową utrzymując wilgotność odpowiadającą 60% pojemności wodnej podłoża. Wzrost i rozwój łubinu przebiegał normalnie. Na początku butonizacji, tj. 11.VI ścięto rośliny kontrolne, w tym też dniu w części wazonów wstrzyknięto w łodygi (pędu głównego) badanych roślin sparteinę w postaci soli siarczanowej w ten sposób, że do każdej z 7 roślin w wazonie wprowadzono po 0,5 ml roztworu wodnego zawierającego 25 mg tego alkaloidu.

Różnic pod względem wzrostu i rozwoju między tymi roślinami a łubinem kontrolnym w czasie wegetacji nie stwierdzono.

Sprzętu dokonywano w następujących terminach: 1. 10 dni po iniekcji — 21.VI, 2. 25 dni po iniekcji — 5.VII 3. w fazie pełnej dojrzałości — 2.IX. Zbierano oddzielnie łodygi, liście i korzenie, a w czasie sprzętu końcowego również i nasiona, dołączając do łodyg łupiny strąków (w tym ostatnim terminie korzeni nie uwzględniono).

Podczas zbiorów w czasie wegetacji sprzątano po trzy wazon-y z kombinacji, w okresie pełnej dojrzałości — po cztery wazon-y. Biorąc pod uwagę fakt, iż w omawianym doświadczeniu trudno było stwierdzić rzeczywiste ilości sparteiny, które pozostały w roślinie bezpośrednio po iniekcji (po wyjęciu igły strzykawki część wprowadzanego roztworu wyciekała z łodygi na zewnątrz), w roku 1958 powtórzono częściowo doświadczenie. Metodyka jego założenia (23.VI) była analogiczna jak w badaniach 1957 r. Na początku butonizacji, dn. 5.VIII do łodyg roślin (trzy rośliny w wazonie) wstrzykiwano dokładnie po 0,3 ml wodnego roztworu, zawierającego 25 mg sparteiny w postaci siarczanu. Do roślin kontrolnych wstrzyknięto tę samą ilość wody destylowanej. Natychmiast po wyjęciu igły otwór zalepiano Scotchem. Mimo to część choć niewielka roztworu wyciekała. Krople jego dokładnie zbierano kapilarą i oznaczano sumaryczną ich objętość. W celu ułatwienia wstrzyknięcia sparteiny rośliny przed zabiegiem doprowadzano do stanu słabego wędnięcia. Po upewnieniu się, że wprowadzony roztwór nie wycieka z łodyg, wazon-y podlano wodą. Liście roślin już po godzinie od chwili wstrzyknięcia wróciły do normalnego stanu turgoru. Sprzętu w sposób analogiczny jak w doświadczeniu poprzednim dokonano (po 2 wazon-y z każdej kombinacji) po 1 1/2 godz., po 2 dniach i po 7 dniach od chwili wstrzyknięcia roztworu.

W celu zbadania ewentualnej roli korzeni w przemianach sparteiny jesienią 1957 r. założono wstępne doświadczenie* z roślinami również w fazie butonizacji, ale pozbawionymi korzeni. Sposób hodowania łubinu pastewnego do tej fazy rozwoju był analogiczny jak w doświadczeniach wyżej omówionych. Nasiona wysiano 2.IX.1957 r. W październiku przeniesiono wazon-y z hali wegetacyjnej do ogrze-

* Mgr A. Sawickiej składamy serdeczne podziękowania za pomoc okazaną przy zakładaniu tego doświadczenia.

wanej szklarni. Dn. 4.XI. rośliny z zawiązanymi pączkami na pędzie głównym pozbawiono korzeni odcinając możliwie sterylnie wraz z nimi również część podliścieniową. Koniec łodygi umieszczono w wężu gumowym połączonym z rurką szklaną znajdującą się w kolbie, która zawierała odpowiednią pożywkę objętości 750 ml.

Skład pożywki podstawowej w mg/l był następujący: KH_2PO_4 — 28, K_2SO_4 — 16; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 60; CaCl_2 — 26; $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ — 2,4; H_3BO_3 — 0,8; MnSO_4 — 0,8; NH_4NO_3 był stosowany w dwóch dawkach, a mianowicie 230 i 460 mg w 1 l roztworu. Na tle tych dwóch kombinacji azotowych część roślin otrzymywała sparteinę dodaną w postaci siarczanu w ilości 375 mg na 1 litr roztworu przed jego sterylizacją. Wprowadzono również dodatkową kombinację kontrolną (z większą dawką azotu), w której do pożywki dodano siarczan sodu w ilości odpowiadającej zawartości siarczanu w zastosowanej dawce sparteiny.

Kolby napełnione odpowiednimi pożywkami zatkałe korkami z waty, w których znajdowała się rurka szklana z wężem gumowym były dwukrotnie sterylizowane w autoklawie. Miejsce zetknięcia łodygi rośliny z wężem po obmyciu alkoholem i sterylną wodą otoczono sterylną watą i papierem. Kolby wraz z roślinami umieszczono w szklarni na odpowiednio skonstruowanym statywie, na którym znajdowały się w ciągu 20 dni, tj. do chwili sprzętu. W tym okresie większość roślin (5 powtórzeń w każdej kombinacji) rozwinęła kwiaty, a u części nawet zaobserwowano zawiązywanie się strąków.

Ilość pobranego roztworu przez roślinę za cały ten okres wahała się we wszystkich badanych kombinacjach od 200 do 300 ml.

Łubiny ze wszystkich doświadczeń poddano analizie na zawartość poszczególnych alkaloidów, przy czym w doświadczeniu pierwszym z roku 1957 poszczególne organy zabijano w ciągu 15 min w temp. 105°C , następnie suszono w temp. 60°C . Rośliny z badań 1958 r. analizowano natychmiast po sprzęcie, po dokładnym roztarciu w moździerzu, podobnie również postępowano z łubinem bez korzeni, z tą jednak różnicą, że w tym wypadku nie oddzielano liści od łodyg. W pierwszych dwóch doświadczeniach analizowano rośliny oddzielnie z każdego wazonu (po 7 względnie 3 rośliny łącznie), w doświadczeniu ostatnim — każdą roślinę oddzielnie.

W doświadczeniach z iniekcją zastosowano ilościową metodę chromatograficzną (Birecka i wsp. 1959), w kombinacjach, w których sparteina została wprowadzona do łodyg — po uprzednim oddestylowaniu tego alkaloidu, przy czym w doświadczeniu z r. 1958, w celu ilościowego oznaczenia ewentualnie występującej lupiny, używano głównie fazy rozwijającej: butanol: toluen: kwas solny (Reifer, Przeczdzicka, Kleczkowska 1959), jednocześnie sprawdzając uzyskiwane wyniki na fazie butanol: 0,1 HCl.

Przy analizie roślin bez korzeni stosowano zmodyfikowaną tylko częściowo metodę Reifera i Niziołka (1957), podobnie (i z tych samych przyczyn) jak postępowano w badaniach nad dynamiką alkaloidów (Birecka, Mazan, Szklarek 1959).

WYNIKI BADAŃ MATERIAŁU ROŚLINNEGO

W tabeli 1 podano plony roślin otrzymane w doświadczeniu I. Jak z nich wynika, różnice między badanymi kombinacjami we wszystkich terminach sprzętu leżą w granicach błędu doświadczenia. Godny uwagi jest fakt braku zwiększenia plonu w okresie od 11.VI do 5.VII. Możliwe jest, iż zjawisko to zostało wywołane (mimo nawet dwukrotnego podlewania roślin w ciągu dnia) silnymi upałami panującymi w tym okresie. Niższe plony liści w fazie pełnej dojrzałości są w dużym stopniu wynikiem ich strat na skutek opadania.

Tabela 1

Plony roślin w g s.m. na wazon (7 roślin)

Doświadczenie I — 1957 r.

Terminy sprzętu	Rośliny kontrolne							
	liście	μ	łodygi	μ	nasiona	μ	razem	korzenie
11.VI	18,90	—	32,80	—	—	—	51,70	—
21.VI	19,65	3,41	32,16	5,05	—	—	51,81	8,10
5.VII	17,92	3,40	34,11	2,25	—	—	52,03	7,92
2. IX	8,75	0,31	58,35	3,79	30,50	3,48	97,60	—
Rośliny, którym wstrzyknięto sparteinę								
21.VI	18,21	1,25	30,99	2,91	—	—	49,20	10,79
5.VII	19,40	2,06	29,47	3,55	—	—	48,87	7,02
2. IX	11,92	2,03	56,36	3,92	31,71	3,86	99,99	—

Badania chromatograficzne (na krążkach bibuły What. nr 1 i nr 3) przy użyciu dwóch kwaśnych faz rozwijających wykazały we wszystkich wypadkach obecność zasad, które według ich rozmieszczenia na chromatogramach (kontrola — wzorce czystych alkaloidów) odpowiadały sparteinie, lupaninie, hydroksylupaninie, a_x i a_y (Birecka i wsp. 1959 a i b). Ponadto często wykrywano w bardzo małych ilościach związek odpowiadający angustifolinie oraz dwa związki reagujące z odczynnikiem Dragendorffa i jodem o R_f (w stosunku do lupaniny) znacznie większym niż R_f angustifoliny, a mianowicie: 1,53—1,57 i 1,73—1,78 — na fазie butanol:toluen:HCl.

W analizach ilościowych w omawianym doświadczeniu tych dwóch związków nie uwzględniono. Angustifolinę, której ilość według szeregu oznaczeń wahała się od 5 do 80% ogólnej zawartości alkaloidów nielotnych z parą wodną, oznaczano najczęściej wraz z lupaniną. W trakcie analiz roślin kontrolnych często dość trudno było oddzielić a_x od hydroksylupaniny, szczególnie w wypadku bardzo małych ich ilości. Dlatego też w tabeli 2, która przedstawia wyniki (średnie z powtórzeń poszczególnych kombinacji) dotyczące zawartości alkaloidów w tych roślinach, podano oba te związki łącznie (stosunek a_x do hydroksylupaniny według większości ozna-

Tabela 2

Zawartość alkaloidów w roślinach kontrolnych
Doświadczenie I 1957 r.

Części roślin	Terminy sprzętu	µg w 1 g p.s. masy					mg w plonie 7 roślin						
		suma- rycznie	sparteiny	pozostałych zasad	w t y m			suma- rycznie	sparteiny	pozostałych zasad	w t y m		
					lupa- niny	hydroksy- lupaniny + a _x	a _y				lupa- niny	hydroksy- lupaniny + a _x	a _y
Liście	11.VI	170	28	142	94	40	8	3,21	0,53	2,68	1,78	0,75	0,15
	21.VI	269	22	247	170	63	14	5,28	0,43	4,85	3,34	1,24	0,27
	5.VII	133	9	123	96	22	5	2,38	0,17	2,22	1,72	0,39	0,09
	2.IX	178	29	149	93	28	27	1,56	0,25	1,30	0,82	0,24	0,24
Łodygi	11.VI	237	37	200	128	57	15	7,78	1,21	6,56	4,20	1,87	0,49
	21.VI	156	13	143	92	30	21	5,02	0,42	4,59	2,96	0,96	0,67
	5.VII	143	11	132	75	45	12	4,90	0,38	4,51	2,57	1,53	0,41
	2.IX	106	13	93	74	15	4	6,19	0,76	5,43	4,33	0,87	0,23
Nasiona	11.VI	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	21.VI	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	5.VII	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2.IX	199	40	159	97	49	14	6,10	1,22	4,88	2,96	1,49	0,42
Część nad- ziemna su- macyjnie	11.VI	212	33	179	115	50	12	10,98	1,74	9,24	5,98	2,62	0,64
	21.VI	199	17	182	122	42	18	10,30	0,85	9,44	6,30	2,20	0,94
	5.VII	139	10	129	83	37	9	7,28	0,55	6,73	4,29	1,92	0,89
	2.IX	142	23	119	83	26	9	13,84	2,24	11,60	8,11	2,60	0,89
Korzenie	11.VI*)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	21.VI	77	15	62	29	31	2	0,62	0,12	0,50	0,23	0,25	0,02
	5.VII	39	ślady	39	18	12	9	0,31	—	0,31	0,14	0,10	0,07
	2.IX*)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

*) korzeni roślin sprężniętych w tych dwóch terminach nie analizowano.

Tabela 3

Zawartość alkaloidów w roślinach, którym wstrzyknięto sparteinę

Doświadczenie I 1957 r.

Części roślin	Terminy sprzętu	µg w 1 g p.s. masy						mg w plonie 7 roślin							
		suma- rycznie	spar- teiny	pozos- tałych zasad	w t y m			suma- rycznie	spar- teiny	pozosta- łych zasad	w t y m				
					lupa- niny	hydrok- syny	a _x				lupa- niny	hydrok- syny	a _x		
														a _y	
Liście	21.VI	1456	746	710	422	176	68	44	26,52	13,58	12,94	7,68	3,19	1,25	0,81
	5.VII	949	360	589	396	95	64	34	18,41	6,99	11,42	7,64	1,86	1,24	0,68
	2.IX	367	123	244	77	108	46	13	4,37	1,46	2,91	0,91	1,29	0,55	0,16
Łodygi	21.VI	1617	709	908	544	211	109	44	50,12	21,97	28,15	16,85	6,55	3,39	1,36
	5.VII	1139	438	701	400	173	69	59	33,58	12,91	20,67	11,77	5,11	2,05	1,74
	2.IX	195	45	150	41	62	29	18	11,04	2,56	8,48	2,30	3,50	1,66	1,02
Nasiona	21.VI	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	5.VII	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2.IX	1181	75	1106	331	624	112	39	37,46	2,38	35,08	10,51	19,76	3,55	1,26
Część nadz. su- marycznie	21.VI	1557	722	835	499	198	94	44	76,64	35,55	41,09	24,53	9,74	4,64	2,17
	5.VII	1064	407	657	398	143	67	49	51,99	19,90	32,09	19,41	6,97	3,29	2,42
	2.IX	528	64	464	137	246	57	24	52,87	6,40	46,47	13,72	24,55	5,76	2,44
Korzenie	21.VI	420	38	382	185	131	58	8	4,53	0,42	4,11	1,99	1,41	0,63	0,08
	5.VII	337	54	283	145	93	36	9	2,37	0,38	1,99	1,02	0,66	0,25	0,06
	2.IX	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

czeń wahał się od 1:3 do 1:1,5)*. Uzyskane dane w dużym stopniu potwierdzają wyniki poprzednich naszych doświadczeń nad badaną formą łubinu (Birecka i wsp. 1959 a). Odnosi się to przede wszystkim do ilościowych stosunków między lupaniną a pozostałymi alkaloidami, jak również do występowania sparteiny. W odróżnieniu jednak od tych doświadczeń w danym wypadku stwierdzono: 1. stosunkowo duże ilości sparteiny w dojrzałych nasionach, 2. przejściowy spadek ogólnej zawartości alkaloidów w okresie odpowiadającym początkowi zakładania się strąków. Przyczyny tych zjawisk są dla nas w chwili obecnej nieznane.

W tabeli 3 podano wyniki ilościowych oznaczeń alkaloidów u roślin, którym wstrzyknięto siarczan sparteiny. Są to również średnie z powtórzeń poszczególnych kombinacji, przy czym odchylenia od średniej były w danym wypadku na ogół większe niż u roślin kontrolnych, w skrajnych przypadkach dochodziły do około 30—350%, w większości swej jednak wynosiły przeciętnie około 15—200% (odnosi się to zarówno do zawartości sparteiny, jak też sumy pozostałych zasad). Uwzględniając nawet ten stosunkowo duży błąd należy stwierdzić (poza nielicznymi przypadkami występującymi w ilościach zasady a_x), iż zawartość wszystkich badanych alkaloidów u roślin, którym wstrzyknięto sparteinę, jest znacznie wyższa niż u łubinu kontrolnego zarówno w 10, 25. dniu po iniekcji, jak i w okresie pełnej dojrzałości.

Najwyższą zawartość sparteiny (40-krotnie większą) obserwuje się w 10 dniu po jej wstrzyknięciu. Jednakże stanowi ona zaledwie około 1/5 ilości zastosowanej. Liście w tym okresie zawierają około 400% ogólnej ilości tego alkaloidu, podczas gdy w korzeniach jest jego tylko 3-krotnie więcej niż w korzeniach roślin kontrolnych. W okresie późniejszym zawartość zarówno procentowa, jak i bezwzględna sparteiny silnie maleje, mimo to nawet w okresie pełnej dojrzałości znajduje się jej znacznie więcej niż u łubinu kontrolnego nie tylko w organach wegetatywnych, ale również i w nasionach. Jest rzeczą charakterystyczną, że zwiększenie i to bardzo znaczne — bo 4-krotne w częściach nadziemnych i 8-krotne w korzeniach — ilości zasad nielotnych u roślin, którym wstrzyknięto sparteinę, nastąpiło właściwie w ciągu pierwszych 10 dni po iniekcji. W następnych zaś fazach rozwoju ich sumaryczna zawartość nie ulegała istotnym zmianom. Jednakże w tym okresie, a szczególnie w końcowych fazach wegetacji, stosunki między poszczególnymi alkaloidami znacznie się zmieniły. Jak wynika z danych tabeli 4, udział a_x , a_y , a szczególnie hydroksylupaniny w ogólnym bilansie zasad nielotnych w organach wegetatywnych znacznie wzrasta. Analogiczne zjawisko, ale tylko w stosunku do hydroksylupaniny, obserwuje się w nasionach. Należy przy tym podkreślić, że o ile w ciągu dwóch i pół miesiąca wegetacji bezwzględne sumaryczne ilości a_x i a_y nie ulegają istotnym zmianom, to bezwzględna zawartość hydroksylupaniny znacznie wzrasta, podczas gdy ilość lupaniny maleje. W odróżnieniu od omawianej kombi-

* Współczynnik ekstynkcji dla a_x i a_y przyjęto prowizorycznie jako 0,10.

T a b e l a 4

Stosunki między poszczególnymi zasadami (nielotnymi)
w nadziemnych organach roślin, którym wstrzyknięto sparteinę
Doświadczenie I 1957 r.

Części roślin	Terminy sprzętu	Lupanina	Hydroksylupanina	a_x	a_y
Liście	21.VI	1	0,41	0,16	0,10
	5.VII	1	0,24	0,16	0,08
	2.IX	1	1,40	0,59	0,16
Łodygi	21.VI	1	0,38	0,20	0,08
	5.VII	1	0,43	0,17	0,15
	2.IX	1	1,50	0,70	0,43
Nasiona	2.IX	1	1,88	0,33	0,11

nacji u roślin kontrolnych nie obserwuje się wyraźnej, jednokierunkowej zmiany stosunków między alkaloidami w miarę starzenia się. W tabeli 5 podano plony otrzymane w 1958 r. w doświadczeniu II. Ze względu na późny siew rośliny były sto-

T a b e l a 5

Plony roślin w g na wazon /3 rośliny/
Doświadczenie II 1958 r.

Czas sprzętu po iniekcji	Rośliny kontrolne										
	Liście wraz z łodygami			Korzenie							
	świeża masa	pow. sucha masa	μ	świeża masa							
1,5 godz	55,15	9,35	1,77	21,30							
2 dni	—	—	—	—							
7 dni	54,95	9,58	0,08	19,70							
	Rośliny, którym wstrzyknięto sparteinę										
	Liście			Łodygi			Cz. nadz. sumaryczn.			Korzenie	
	św. m.	pow. s. m.	μ	św. m.	pow. s.m.	μ	św.m.	pow. s.m.	μ	św.m.	
	1,5 godz.	58,80	6,50	0,02	30,30	5,08	0,19	89,10	11,58	0,20	28,15
	2 dni	50,85	8,52	0,11	32,90	5,53	0,31	83,75	14,05	0,42	29,20
7 dni	50,09	8,39	0,14	35,92	6,03	0,24	86,01	14,42	0,38	32,65	

sunkowo niewielkie i w niedostatecznym stopniu wyrównane. W celu ułatwienia ilościowego wprowadzenia roztworu sparteiny wybrano dla tej kombinacji rośliny możliwie o największej i najgrubszej łodydze. Z tych też względów, łubin kontrolny

ma stosunkowo mniejszą masę, szczególnie w drugim i trzecim terminie sprzętu. Jest rzeczą charakterystyczną, że już po upływie 1 1/5 godz. od chwili wstrzyknięcia około połowa zawartości sparteiny znalazła się w liściach, podczas gdy w korzeniach wykryto zupełnie minimalne jej ilości (tab. 6). Analogiczny stan rzeczy wystę-

Tabela 6
Zawartość sparteiny w roślinach
(w mg w plonie 3 roślin)
Doświadczenie II 1958 r.

Czas sprzętu po iniekcji	Rośliny kontrolne		Rośliny, którym wstrzyknięto sparteinę				
	zawartość sparteiny w mg		ilość sparteiny w roztworze pozostałym po iniekcji w łodygach 3 roślin w mg	zawartość sparteiny w mg			
	część nadz.	korzenie		liście	łodygi	korzenie	sumarycznie
1,5 godz.	0,347	ślady	58	27,425	27,850	0,177	55,452
2 dni	—	—	56	27,000	25,737	0,281	53,018
7 dni	0,274	ślady	65	19,325 *	7,625	0,157	27,107

* Średnie z dwóch powtórzeń bardzo rozbieżnych: 1) 25,800 i 2) 12,850, przy czym ilości sparteiny w roztworze pozostałym w roślinie po wstrzyknięciu w obu powtórzeniach były prawie identyczne — 64 i 66 mg.

puje również i po dwóch dniach, przy czym w zasadzie, biorąc pod uwagę błąd doświadczenia, nie stwierdza się istotnego zmniejszenia ilości tego alkaloidu. Zjawisko to natomiast można już wyraźnie zaobserwować w roślinach sprzętniętych po upływie 7 dni od chwili iniekcji, szczególnie w łodygach. Niestety jednak wyniki te obciążone są znacznym błędem ze względu na duże rozbieżności między powtórzeniami w zawartości sparteiny w liściach. Dane dotyczące zawartości pozostałych alkaloidów w częściach nadziemnych (tabela 7) wskazują na pewien ich wzrost, szczególnie lupaniny już po 1 1/5 godz. od iniekcji. Po upływie 7 dni bezwzględna ilość tych związków zwiększa się ponad dwukrotnie, przy czym w tym czasie obok największego wzrostu zawartości lupaniny obserwuje się również znaczny wzrost ilości hydroksylupaniny i α_x ; ilości pozostałych zasad nie ulegają większym zmianom. Korzenie (tab. 8) badanych kombinacji po 1 1/2 godz. od iniekcji nie wykazują żadnych istotnych różnic. Różnice te na korzyść roślin, którym wstrzyknięto sparteinę, przejawiają się dopiero po upływie 7 dni, szczególnie jeśli chodzi o zawartość lupaniny. Należy jednak podkreślić, że wzrost zawartości zasad nietlotnych z parą wodną, przypadający na okres między pierwszym a siódmym dniem

Tabela 7

Zawartość poszczególnych alkaloidów nielotnych z parą wodną
w częściach nadziemnych roślin w μg w plonie 3 roślin

Doświadczenie II 1958 r.

Czas sprzętu po iniekcji	Części roślin	Lupanina	Hydroksylupanina	a_x	a_y	Angustifolina	Sumarycznie	Pozostałe zasady*
Rośliny kontrolne								
1,5 godz.	liście + łodygi	534	349	468	519	268	2138	324
7 dni	„	425	232	372	292	350	1671	378
Rośliny, którym wstrzyknięto sparteinę								
1,5 godz.	liście	1277	532	684	302	241	3036	680
	łodygi	585	235	265	86	55	1226	236
	sumarycznie	1862	767	949	388	296	4262	916
7 dni	liście	3222	1259	1135	503	379	6498	696
	łodygi	1838	667	541	93	74	3213	314
	sumarycznie	5060	1926	1676	596	453	9711	1010

* Suma związków o R_f większym od R_f angustifoliny; współczynnik ekstynkcji przyjęto prowizorycznie jako 0,10.

Tabela 8

Zawartość alkaloidów nielotnych w korzeniach w μg w plonie
korzeni 3 roślin

Doświadczenie II 1958 r.

Czas sprzętu po iniekcji	Lupanina	Suma hydroksylupaniny $a_x + a_y$	Angustifolina	Sumarycznie	Pozostałe zasady *
Rośliny kontrolne					
1,5 godz.	73	75	45	193	91
7 dni	31	86	28	145	49
Rośliny, którym wstrzyknięto sparteinę					
1,5 godz.	48	71	21	140	62
7 dni	385	168	46	599	280

* Suma dwóch związków o R_f większym od R_f angustifoliny; współczynnik ekstynkcji przyjęto prowizorycznie jako 0,10.

doświadczenia, jest bez porównania mniejszy aniżeli różnica odpowiadająca zmniejszeniu się ilości sparteiny w tym okresie; szczególnie dotyczy to łodyg.

W tabeli 9 podano średnie plony oraz zawartość alkaloidów w roślinach bez korzeni (liście i łodygi łącznie). Różnice między plonami świeżej masy badanych kombinacji leżą w granicach błędu doświadczenia. To samo w zasadzie należy stwierdzić odnośnie do zawartości sparteiny jak i pozostałych alkaloidów w kom-

T a b e l a 9

Zawartość alkaloidów w roślinach bez korzeni w mg w 1 roślinie

Doświadczenie III

K o m b i n a c j e			Plon rośliny w g świeżej masy	Zawartość alkaloidów w mg	
Dawka NH_4NO_3 w mg/l l wody	Na_2SO_4 mg/l l	sparteina w mg/l l wody		sparteina	pozostałe zasady
230	0	0	9,09	0,18	0,40
460	0	0	8,06	0,12	0,29
460	171	0	8,13	0,07	0,34
230	0	375	10,94	28,50	4,24
460	0	375	10,22	27,98	3,73

binacjach kontrolnych. Natomiast rośliny, które znajdowały się na pożywce zawierającej sparteinę, wykazują stosunkowo bardzo duże jej ilości. Jednocześnie zawartość pozostałych zasad u tych roślin znacznie, bo 10-krotnie wzrasta w porównaniu z kombinacjami kontrolnymi. Niestety na skutek niemożności zastosowania jeszcze w trakcie analiz omawianego doświadczenia chromatograficznej metody ilościowej, nie posiadamy dokładnych danych dotyczących stosunków między poszczególnymi alkaloidami. Jednak pół ilościowe badania chromatograficzne wykazały, że dominującą zasadą była lupanina 80 — 90% ogólnej zawartości alkaloidów nie-lotnych, zaś zawartości hydroksylupaniny mało się różniły od zawartości tego alkaloidu w roślinach kontrolnych.

DYSKUSJA

Na tle przedstawionych wyżej wyników badań wydaje się celowe omówienie przede wszystkim dwóch zagadnień częściowo z sobą związanych, a mianowicie: 1) zdolności formy pastewnej łubinu białego do zachowania wprowadzonego alkaloidu, w naszym wypadku sparteiny i 2) przemian sparteiny na inne alkaloidy.

Zawartość alkaloidów w badanym łubinie we wszystkich doświadczeniach nie przekraczała 0,020% pow. suchej masy, a więc jest to populacja wybitnie pastewna. Ta niska zawartość może być wynikiem albo słabej w porównaniu z populacjami gorzkimi syntezy alkaloidów, albo też określonego stosunku między intensywnością ich syntezy i intensywnością ich rozkładu na związki niealkaloidowe, stosunku,

który powinien być w danym wypadku przeciętnie zbliżony do 1. Wprowadzenie alkaloidu do rośliny z zewnątrz może w pewnym stopniu służyć jako wskaźnik przejawiania się tych ewentualnych procesów rozkładu.

Wstrzyknięta przez nas do łodyg sparteina w stosunkowo dużych ilościach bardzo szybko przemieszczała się do liści, w minimalnym stopniu natomiast do korzeni. Wydaje się również, iż w tym wypadku nie mamy do czynienia z silną sorpcją tego alkaloidu przez tkanki przewodzące np. naczyniowe, jak to obserwowano przy wprowadzeniu nikotyny u *Nicotiana* (3). Świadczy o tym szybkość jej przemian na inne alkaloidy, do czego wrócimy niżej.

Trudno we wszystkich naszych doświadczeniach przeprowadzić dokładny bilans alkaloidów. Niemniej jednak uzyskane wyniki świadczą raczej o tym, że sparteina z biegiem czasu po wstrzyknięciu ulega przemianie na związki niealkaloidowe. Na dowód tego mogą służyć następujące fakty: 1. wyraźne zmniejszanie się ilości sparteiny we wszystkich organach nadziemnych, poczynając co najmniej od 20 dnia po jej wstrzyknięciu — w doświadczeniu I, 2. zmniejszanie się ilości tego alkaloidu (udowodnione dla łodyg) po 7 dniach w doświadczeniu II, 3. jeżeli przyjąć, że w kulturach bezkorzeniowych związki zawarte w pożywce pobierane były biernie, wraz z prądem transpiracyjnym, to ilość sparteiny stwierdzona w roślinie jest znacznie mniejsza niż jej ilość zawarta w 200—300 ml płynu pobranego przez tę roślinę w czasie trwania doświadczenia. Należy przy tym podkreślić, że stwierdzone ilości innych alkaloidów, które mogły powstać ze sparteiny, są we wszystkich trzech doświadczeniach bez porównania mniejsze aniżeli ilości odpowiadające spadkowi zawartości tego ostatniego alkaloidu. Oczywiście uzyskane przez nas wyniki nie mogą dać odpowiedzi na pytanie, czy przemiany sparteiny na związki niealkaloidowe miały charakter bezpośredni, czy też przebiegały one dopiero po przekształceniu się jej w inne alkaloidy.

Warto również zauważyć, że przemiany te najprawdopodobniej głównie zachodziły w liściach i łodygach, a nie w korzeniach. Biorąc pod uwagę ilości wprowadzonej sparteiny jak i masę rośliny należy sądzić, że te procesy (w warunkach doświadczalnych) przebiegały jednak dość wolno, alkaloid ten bowiem można znaleźć w roślinach w większych ilościach w porównaniu z lubinem kontrolnym nawet po 2 1/2 miesiąca od chwili wstrzyknięcia.

Uzyskane wyniki wskazują na to, iż sparteina może częściowo przekształcić się w inne alkaloidy występujące w lubinie białym pastewnym. Jest przy tym rzeczą charakterystyczną, że w roślinach, którym ten alkaloid wstrzyknięto, zwiększa się znacznie ilość nie tylko lupaniny oraz hydroksylupaniny, ale również i zasad nazwanych przez nas a_x i a_y czy też związków o R_1 większym niż R_1 angustifoliny. Jeśli nawet związki te nie są typowymi alkaloidami, to jednak stwierdzona zależność świadczy o tym, że mogą one pochodzić ze sparteiny.

Przemiana sparteiny na inne alkaloidy wydaje się zachodzić dość szybko, gdyż już po 1 1/2 godz. od chwili jej wstrzyknięcia można stwierdzić pewien wzrost zawartości tych związków w roślinach. Godny uwagi jest jednak fakt, iż sumaryczna

ilość alkaloidów nielotnych z parą wodną w doświadczeniu I nie ulegała w zasadzie zwiększeniu po upływie 10 dni od wprowadzenia sparteiny. Natomiast w tym następnym okresie aż do pełnej dojrzałości występuje wyraźne zmniejszanie się ilości lupaniny przy jednoczesnym zwiększaniu się zawartości hydroksylupaniny. Zaobserwowane zjawisko wskazywałoby na to, że proces ewentualnego utlenienia sparteiny do lupaniny przebiega w roślinie na początku szybciej niż proces utlenienia się tej ostatniej do hydroksylupaniny, oczywiście pod warunkiem, że stwierdzone ilości tych alkaloidów nie są również częściowo wynikiem różnej intensywności ich rozkładu. Należy podkreślić, że wzrost zawartości alkaloidów nielotnych z parą wodną występuje nie tylko w liściach, ale również w nie mniejszym stopniu i w łodygach. Wydaje się także, że procesy do tego prowadzące mogą przebiegać bez udziału korzeni. Podobnie i ewentualne przekształcanie się lupaniny w hydroksylupaninę wydaje się zachodzić zarówno w liściach, jak i w łodygach. Uzyskane wyniki nie pozwalają na wyciąganie wniosków, czy to przekształcanie przebiega również w strąkach, czy też wysoka stosunkowo zawartość hydroksylupaniny w nasionach jest tylko wynikiem intensywniejszego jej przemieszczania się z organów vegetatywnych.

Przeprowadzone przez nas badania z roślinami raczej potwierdzają istniejące hipotezy dotyczące roli sparteiny w syntezie niektórych innych alkaloidów łubinowych. Jednakże otrzymane wyniki nie dają całkowitej pewności, czy u łubinu, w danym przypadku białego, rzeczywiście sparteina jest jedyną formą, względnie jedną z kilku form wyjściowych dla pozostałych badanych zasad, czy też zaobserwowane przez nas zależności są tylko wynikiem reakcji rośliny, szczególnie jej enzymów biorących udział w procesach redukcji i utleniania na wprowadzoną z zewnątrz substancję mogącą ulec utlenieniu.

W celu wyjaśnienia i ewentualnego rozstrzygnięcia nasuwających się wątpliwości w prowadzonych obecnie badaniach nad tymi zagadnieniami stosujemy radioaktywny węgiel (C^{14}).

STRESZCZENIE WYNIKÓW

1. Sparteina wprowadzona w postaci soli siarczanowej do łubinu białego pastewnego w fazie butonizacji ulega w późniejszym okresie dość znacznemu zmniejszeniu ilościowemu. Niemniej jednak nawet w końcu wegetacji można było ją częściowo znaleźć we wszystkich organach roślin łącznie z nasionami.

2. To zmniejszenie się ilości sparteiny jest prawdopodobnie wynikiem częściowego przekształcania się jej w związki niealkaloidowe, przy czym procesy do tego prowadzące — jak się wydaje — przebiegały (w warunkach doświadczalnych) głównie w liściach i łodygach.

3. Rośliny, którym wstrzyknięto sparteinę, wykazywały w porównaniu z roślinami kontrolnymi znacznie większe (4—5 krotne) ilości alkaloidów nielotnych z parą wodną, a mianowicie lupaniny i hydroksylupaniny, jak również a_x , a_y , oraz dwóch innych związków prawdopodobnie również zasad azotowych. To zwiększe-

nie ilościowe tych czterech bliżej jeszcze nie poznanych substancji świadczy o tym, że mogą one pochodzić ze sparteiny.

4. W pierwszym okresie po wprowadzeniu sparteiny głównie wzrasta w roślinach zawartość lupaniny, w okresie następnym ilość tego alkaloidu maleje, a jednocześnie silnie zwiększa się zawartość hydroksylupaniny; na skutek tego stosunek między lupaniną a hydroksylupaniną w ciągu 10 tygodni wegetacji uległ zmianie (przeciętnie dla całej rośliny) z 1:0,39 do 1:1,78.

Katedra Fizjologii Roślin SGGW
w Warszawie

(Wpłynęło dn. 14. 10. 1958 r.)

SUMMARY

1. Amounts of sparteine introduced into the white sweet lupine as the sulfate salt during butonisation decrease considerably in later stages. However sparteine was detectable in all parts of the plant including the seeds at the end of vegetation period.

2. This decrease of sparteine is probably due to its partial decomposition into nonalkaloidal compounds. It would appear, that the process takes place mainly in the leaves and stems.

3. Plants, to which sparteine has been introduced, contain 4 to 5 times more nonsteam-distilable alkaloids. These are: lupanine, hydroxylupanine, as well as a_x and a_y and two other compounds, which probably are also nitrogen bases. The increase of the four unidentified substances proves, that they may originate from sparteine.

4. In the first days after introduction of sparteine into the plant an increase of the lupanine content could be observed. Later on, the amount of lupanine decreases with a marked increase of hydroxylupanine. As a result of this the proportion of lupanine: hydroxylupanine changes (on the average for the whole plant) during ten weeks of vegetation from 1:0,39 to 1:1,78.

LITERATURA

- Birecka H., Rybicka., Ścibor-Marchocka A., 1959, Alkaloidy *Lupinus albus* i metoda ich oznaczania ilościowego, Acta Bioch. Pol. 6 (1).
- Birecka H., Mazan A., Szklarek D., 1959, Badania nad alkaloidami łubinu białego (*Lupinus albus*) w czasie jego wegetacji, Acta Soc. Bot. Pol. 28 (2).
- Dawson R. F., 1952, Alkaloid biogenesis: Nicotine demethylation in excised leaves of *Nicotiana glutinosa*, Amer. Jour. of. Botany 39 (4).
- Hegnauer M. R., 1955, Cosidérations botaniques et biogénétiques sur les alcaloides du genre *Lupinus*, Bul. Soc. Pharm. de Bordeaux 94 (nr spécial 209).
- Van der Kuy A., 1956, Bijdrage tot kennis van alkaloidevorming bij enkele species van het genus *Lupinus*, S- Gravenhage, dysertacja.
- Nowacki E., 1958, Investigation on the in vivo metabolism of the sparteine group of alkaloids, Bul. de l'Académie Pol. des Sc. 6 (1).
- Nowacki E., 1958, Badania nad syntezą alkaloidów w łubinie, Roczn. Nauk Roln. 79 (2).
- Reifer I., Niziołek S., 1957, Kolorymetryczna mikrometoda oznaczania alkaloidów w nasionach łubinu, Acta Bioch. Polon. 4 (3).
- Reifer I., Przeździecka N., Kleczkowska D., 1959, Chromatograficzna metoda ilościowego oznaczania alkaloidów łubinowych, Acta Bioch. Pol. 6(1).
- Worker G., 1956, Die Chemie der natürlichen Alkaloide, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.