Badania nad absorpcją sacharozy przez epidermę *Allium cepa*

Researches on the absorption of sucrose by the epidermis of Allium cepa

ZOFIA TURNOWSKA-STARCK

Sacharoza jest związkiem, który przenika do żywych komórek wolniej od wielu innych związków organicznych (Collander, Bärtund (wg Bonnera i Galstona)). O nieznacznym przenikaniu sacharozy do komórki świadczy pośrednio fakt powszechnego stosowania roztworu sacharozy jako plazmolityka. Te własności są uzależnione od braku ładunku elektrycznego cukrów oraz od małego powinowactwa do lipidów.

Phillis i Mason (1937), Weatherley (1954), Harley i Smith (1956), Collander (1957) wykazali, że absorpcja sacharozy jest procesem aktywnym i wymaga stałego dostarczania energii. W świetle licznych hipotez cukry mogą przemieszczać się w postaci estrów kwasu fosforowego (Dormer i Street 1949, Street i Lowe (1950), Le Fevre (wg Steinbacha 1951) i inni). Być może, że na powierzchni komórek znajdują się aktywne fosfatazy, które ułatwiają przenikanie cukrów do wnętrza komórki lub też biorą udział w tym procesie jakieś inne układy enzymatyczne. Danielli (1954), Burgström 1941 (wg Robertsona 1956), Harley i Smith (1956), Rothstein (1954) Säid 1948, stwierdzili na powierzchni komórek obecność enzymów, które dokonują inwersji sacharozy przed jej absorpcją.

W ostatnich latach ukazało się kilka prac wskazujących na jeszcze inną możliwość przenikania sacharozy przez plazmę. Gauch i Dugger (1953) po raz pierwszy zauważyli znacznie intensywniejsze przemieszczanie sacharozy znakowanej C^{14} u pomidorów i fasoli, gdy do roztworu cukru dodano 10 mg B na 1 l w postaci H_3BO_3 . W późniejszych pracach (Sisler, Dugger, Gauch 1956, Dugger, Humphrey, Calhoun 1957, Mitchell, Dugger, Gauch 1953, Nelson 1956, Mc Ilrath, Palser 1955, Gauch i Dugger 1954) również obserwowali pośredni lub bezpośredni wpływ boru na przemieszczanie węglowodanów.

Autorzy podają tu dwie alternatywy tego działania:

1. Bor może wpływać na sam proces przemieszczania cukrów dzięki łatwości, z jaką tworzy kompleksowe połączenia z grupami OH (Zittle 1951). W tym przypadku sacharoza mogłaby się przemieszczać jako ester kwasu borowego, który w roztworach wodnych dysocjuje tworząc aniony.

2. Bor może pośrednio wpływać na przemieszczanie cukrów poprzez oddziaływanie na biokolojdy plazmy. W świetle tej hipotezy należałoby się spodziewać wpływu boru na absorpcję cukrów.

Pierwsza hipoteza jest raczej mało prawdopodobna. Gdyby istniała możliwość przemieszczania boru wraz z cukrami, wówczas musiałby on wykazywać dużą zdolność do reutilizacji. Tymczasem bor jest pierwiastkiem wyjątkowo mało ruchliwym, czego między innymi dowodzi występowanie pierwszych objawów głodu borowego na najmłodszych częściach rośliny (Johnson i Fisher 1930, Szkolnik 1950, R. Starck 1955).

Zeigler (1956) analizując płyn wyciśnięty z floemu drzew stwierdził w nim minimalne ilości boru, co również pośrednio zaprzecza hipotezie o wędrówce kompleksów cukrowo-borowych.

W świetle powyższych faktów pozostaje druga możliwość — wpływu boru na przepuszczalność plazmy.

Rozstrzygnięcie tego zagadnienia nastrocza bardzo poważne trudności metodyczne, nie dysponujemy bowiem ścisłymi metodami bezpośredniego badania przepuszczalności plazmy. Najczęściej, poza metodami plazmolitycznymi, uciekać się musimy do pomiarów absorpcji sacharozy przez poszczególne organy, tkanki albo komórki.

O'Kelley (1957) wykazał, że bor dodany do roztworu sacharozy w ilości 10 mg/l wpływa w dość nieznacznym stopniu na absorpcję sacharozy i glukozy przez ziarna pyłku *Tecoma radicans*, natomiast wywiera ujemny wpływ na przenikanie fruktozy. Podobne zależności stwierdzono przy 1 i 100 mg B/l.

W niniejszej pracy przebadano wpływ boru i fosforu na absorpcję sacharozy. Ponadto chodziło o zbadanie wpływu boru na przenikanie cukrów, zależnie od oświetlenia, do komórek nie asymilujących dwutlenku węgla. Jako obiekt wybrano skórkę cebuli. Jest to tkanka jednowarstwowa, co wyklucza możliwość przenikania roztworu sacharozy do przestworów międzykomórkowych.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Metoda badań

Doświadczenia prowadzono w miesiącach zimowych na epidermie pochodzącej z wewnętrznej strony łusek cebuli, odmiany Wolskiej, przechowywanej w chłodni. Wybierano cebule w przybliżeniu jednakowej wielkości i kształtu (ok. 150—200 g). Próbkę do wszystkich kombinacji pochodziły z tych samych cebul. Zależnie od ilości kombinacji (6 lub 8) cebule dzielono na 6 lub 8 równych sektorów. Z każdego z nich zrywano tylko jedną określoną łuskę. W ten sposób próbka składała się z 6 lub 8 łusek pochodzących z różnych cebul.

Świeżo oderwana skórka była natychmiast ważona na wadze analitycznej (pół-automatycznej) i zanurzana w odpowiednim roztworze. Wszystkie czynności

(zdzieranie skórki, ważenie i umieszczanie w roztworze) trwały nie dłużej niż 5 min. Łuski umieszczano w małych szalkach Petriego dbając o to, by były one całkowicie zanurzone i nie pozwijane. W każdej szalce umieszczono 2 lub 3 skórki. W ten sposób materiał stanowiący jedną próbkę znajdował się w trzech szalkach. Roztwory do doświadczeń przygotowywano z wody destylowanej, przedmuchiwanej przez 30 min. powietrzem (chodziło o nasycenie ich tlenem).

W celu ujednolicenia temperatury i wilgotności szalki przykrywano zlewką na 250 ml i umieszczano w łaźni wodnej z termoregulacją. Temperatura wynosiła $30^{\circ} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Czas przebywania w różnych roztworach w większości doświadczeń wynosił 4 godz.

Po tym okresie łuski wyjmowano pensetą, opłukiwano wodą destylowaną i zabijano we wrzącym 80⁰/₀ alkoholu. Przed przystąpieniem do analizy materiału odparowywano alkohol, skórki rozcierano w szklanym homogenizatorze. Materiał poddawano hydrolizie 2—3⁰/₀ HCl przez 3 godziny i cukry oznaczano jodometrycznie mikrometodą Fuita Akiji i Danzo Iwatake (1931).

Wyniki wyrażono w mg cukrów prostych przypadających na 1 g świeżej masy skórek.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Doświadczenia wstępne

Przed przystąpieniem do badań właściwych przeprowadzano doświadczenia o charakterze metodycznym. Początkowo do jednej próbki brano tylko jedną skórkę z jednego sektora cebuli, lecz w tym przypadku otrzymano bardzo duże rozbieżności w absorpcji cukru pomiędzy powtórzeniami. Wynikało to w dużej mierze z różnic indywidualnych poszczególnych cebul. Średnie obliczone z dwunastu powtórzeń zestawione są w tabeli 1. Wielkość absorpcji obliczano z różnicy zawartości cukrów w łuskach umieszczonych w roztworze sacharozy i w wodzie.

Tabela 1

Absorpcja sacharozy przez epidermę *Allium cepa*

Zawartość cukrów w mg na 1 g świeżej masy				Absorpcja sacharozy	
po 3 godz. w wodzie		po 3 godz. w sacharozie		w mg na 1 g świeżej masy	
średnio	maks. odchylenia	średnio	maks. odchylenia	średnio	maks. odchylenia
47,00	67,95—40,32	90,01	132,45—60,44	43,01	86,46—12,11

W tych doświadczeniach absorpcja przewyższała w niektórych przypadkach 3-krotnie zawartość cukrów w łuskach kontrolnych. Przy stosowaniu próbek pochodzących z 8 różnych cebul nie było takiej rozbieżności między powtórzeniami.

Powierzchnia epidermy po oderwaniu od łuski jest chropowata, pozostają na niej resztki porozyrywanych komórek mięksiszowych łuski. Zachodziła obawa, że

te właśnie uszkodzone strzępki tkanki mogą adsorbować pewną część sacharozy zwiększając w ten sposób ilość pobranych z roztworu cukrów. W celu sprawdzenia takiej możliwości zanurzono całe łuski do 100/0 sacharozy na 3 godziny (po 8 łusek) z nieoderwaną epidermą. Po tym czasie skórę delikatnie zdarto z każdej łuski, wypłukano w wodzie destylowanej i oznaczono zawartość cukrów. Kontrolę stanowiły łuski umieszczone w wodzie.

Dane ilustruje tabela 2 stanowiąca średnie z 8 powtórzeń.

Tabela 2

Absorpcja sacharozy przez epidermę *Allium cepa*
(skórki nie oddzielone od łusek w czasie absorpcji)

mg cukrów na 1 g świeżej masy		Absorpcja w mg na 1 g św. m.
w wodzie	w 100/0 sacharozie	
18,84	26,94	8,10

Z porównania wyników tego doświadczenia z danymi zestawionymi w tabeli 1 wynika, że cukry przenikają w znacznie większej ilości przez powierzchnię oderwaną od łuski lub też że w tym doświadczeniu część cukrów przemieściła się ze skórki do mięsistej łuski. Dlatego też w dalszych doświadczeniach nie pracowano z całymi łuskami. Nasunęła się więc konieczność oceny ilości cukrów znajdujących się w mikropilarach błon komórkowych i w zniszczonych strzępkach warstwy komórek przylegających do łuski. W tym celu oderwane skórki umieszczano na 3 godziny w 100/0 sacharozie lub w wodzie. Część próbek płukano tylko 3-krotnie wodą destylowaną i zabijano. Pozostałe próbki po ostatnim płukaniu przetrzymywano przez 5 minut w kąpeli wodnej celem odpłukania cukrów, które nie przeniknęły do plazmy. Różnice w zawartości cukrów w próbkach trzymanyh w sacharozie i w wodzie przeliczone na 1 g świeżej masy skórki przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3

Wpływ płukania na desorpcję cukrów z epidermy cebuli

Różnice w zawartości cukrów w próbkach trzymanyh w sacharozie
i w wodzie w mg cukrów prostych na 1 g św. m.

Sposób płukania	Powtórzenia				Średnio
	I	II	III	IV	
Płukane 3-krotnie	132,09	120,33	240,13	199,37	172,98
Dodatkowo 5 min. kąpeli	44,56	51,81	83,44	79,61	64,85

Z tabeli 3 wynika, że w obu przypadkach jest duża rozbieżność między powtórzeniami, jednak wielkość absorpcji jest przeszło 2,5 razy większa w przypadku, gdy epidermę po wyjęciu z sacharozy oplotowano tylko powierzchniowo. Wynika z tego, że duża część cukrów, którą wykrywano w skórkach po powierzchniowym przepłukaniu, nie przeniknęła przez żywą plazmę do wnętrza komórki.

Nasunęła się z kolei konieczność przebadania czasu potrzebnego do usunięcia cukrów nie zaabsorbowanych przez plazmę. W tym celu skórki zanurzone na 4 godziny w roztworze sacharozy lub w wodzie, a następnie po trzykrotnym przepłukaniu powierzchniowym przetrzymywano je przez 30 minut w wodzie w następujący sposób: skórki trzymano w trzech wodach, przy czym w pierwszej przetrzymywano je 5 minut, w drugiej również 5 minut, a w trzeciej 20 minut. Wszystkie trzy roztwory analizowano, a ilość zanalizowanych cukrów po ostatnim płukaniu podzielono przez 4. W ten sposób obliczono przybliżoną szybkość wypłukiwania cukrów w ciągu 5 minut. Tak obliczona średnia szybkość obciążona jest dużym błędem, gdyż tempo wypłukiwania cukrów w ciągu całego czasu (20 min.) najprawdopodobniej nie było jednakowe. Gdyby można było uwzględnić to na wykresie.

Ryc. 1. **a** — Szybkość wypłukiwania cukrów z epidermy *A. cepa* z przeliczeniu na 1 g św. masy i na 5 min. (w mg cukrów prostych). A — po 5 min. kąpieli; B — po następnych 5 min. kąpieli; C — po następnych 20 min. kąpieli.

b — Wielkość absorpcji sacharozy po różnym czasie kąpieli.

a — The rate of washing out sugars from the epidermis of *A. cepa* calculated for 1 g of fresh mass and 5 min. (in mg of simple sugars). A — after 5 minutes bath; B — after next 5 min. bath; C — after next 20 min. bath.

b — The intensity of absorption of sucrose after different bath time

różnice między ilością wypłukanych cukrów w kolejnych 5 minutowych odstępach czasu byłyby jeszcze większe. Otrzymane wielkości zilustrowano na ryc. 1a.

Na ryc. 1b zobrazowano wielkość absorpcji cukrów w skórkach po różnym czasie kąpieli w wielkościach bezwzględnych. Z obu wykresów wynika, że najwięcej cukrów wypłukuje się w ciągu pierwszych 10—15 minut, po czym intensywność desorpcji słabnie. Nasuwa to przypuszczenie, że po zbyt długotrwałej kąpieli obserwuje się przechodzenie cukrów z plazmy do roztworu zewnętrznego.

Aby mieć dodatkową kontrolę przebiegu tego procesu, przetrzymywano skórki cebuli przez godzinę w 1:50 000 wodnym roztworze błękitu metylenowego. Po tym czasie przenoszono skórki do kąpeli wodnej kolejno na 5 min. i trzykrotnie po 10 minut. W wodzie po każdorazowej kąpeli oznaczano kolorometrycznie ilość barwnika, przy zastosowaniu kolorymetru Leitza.

Wyniki przedstawiono na ryc. 2. Ponieważ w obu przypadkach najczęściej wypłukuje się związków w ciągu pierwszych 5—15 min., dlatego też we wszystkich dalszych doświadczeniach skórki płukano 3-krotnie wodą i przetrzymywano 15 min. w kąpeli wodnej. Chcąc dokładniej poznać charakter absorpcji cukrów w tych doświadczeniach przebadano dynamikę pochłaniania sacharozy z 50% roztworu.

Wyniki dwóch takich doświadczeń zilustrowane są na ryc. 3, na której podano średnie arytmetyczne z 4 powtórzeń. Jedno doświadczenie trwało 4 godz., a następne

Ryc. 2. Wypłukiwanie błękitu metylenowego z epidermy *A. cepa*

The washing out of methylene blue from the epidermis *A. cepa*

Ryc. 3. Dynamika absorpcji sacharozy przez epidermę *A. cepa* (dośw. z 21.I.1958 i 7.II.1958)

Absorption dynamics of sucrose by the epidermis of *A. cepa* (experiment from 21.I.1958 and 7.2.1958)

6 godz. Na obu krzywych zarysowuje się gwałtowna absorpcja w ciągu pierwszych 15 minut do 1 godziny, po czym szybkość gromadzenia cukrów maleje, choć w bezwzględnych wartościach absorpcja wzrasta nieznacznie nawet w ciągu piątej i szóstej godziny.

Taki przebieg krzywej nie wskazuje wyraźnie na aktywny transport cukru i dlatego przebadano jeszcze wpływ temperatury. Doświadczenia prowadzono w 10° i 30°C, zanurzając skórki cebuli na 4 godziny w 50% roztworze sacharozy i w wodzie. Wyniki zebrano w tabeli 4.

Z liczb przytoczonych w tabeli 4 wynika, że przenikanie cukrów zależy w sposób widoczny (i statystycznie udowodniony) od temperatury. Przy wzroście temperatury o 20°C prawie dwukrotnie wzrosła absorpcja sacharozy.

Tabela 4

Wpływ temperatury na absorpcję sacharozy przez epidermę cebuli
20.III.58

Temperatura w °C	Absorpcja cukrów w mg na 1 g świeżej masy				Średnio
	I	II	III	IV	
10±1°	6,66	7,16	14,58	10,39	9,70*
30±0,5°	13,05	13,36	20,48	22,05	17,24*

Powtórzenie I i II z jednej ósemki cebul; powtórzenie III i IV z drugiej ósemki cebuli.

Obliczenia statystyczne wykonano na podstawie analizy zmienności przy pomocy „F” Snedecora.

* Różnice udowodnione przy $P = 0,05$.

Przedział ufności przy $P_{0,05} = 7,26$.

* Błąd dośw. $\mu_x = 2,97$.

Wpływ boru na absorpcję sacharozy

W tych doświadczeniach zastosowano metodykę wyżej opisaną. Skórki zanurzone w następujących płynach:

woda

woda + kwas borowy (10 lub 50 mg B/l)

50/0 sacharoza

50/0 sacharoza + kwas borowy (analogicznie 10 lub 50 mg B/l)

W pierwszym doświadczeniu badano łączny wpływ boru i oświetlenia.

Jako źródło światła zastosowano dwie lampy jarzeniowe i 2 żarówki lustrzane 500 wataw. Natężenie światła, po przejściu przez 3 cm warstwę wody i szkło

Ryc. 4. Wpływ światła i boru na absorpcję sacharozy przez epidermę *Allium cepa*
S — sacharoza; SB — sacharoza + bor H_3BO_3 ; I — światło; II — ciemność; 24.I dodawano 10 mg B/l; 7.II dodawano 50 mg B/l

The influence of light and boron on sucrose absorption by the epidermis of *Allium cepa*
S sucrose; SB sucrose + boron as H_3BO_3 ; I — light; II — darkness; 24th Jan — 10 mg.B/l. was added; 7th Febr. — 50 mg. B/l was added

zlewki nakrywającej szalki wynosiło około 18 tys. luksów (pomiar luksomierzem prod. radzieckiej typ O.L.3). Próbkę w ciemności osłanianą takimi samymi zlewkami pomalowanymi na czarno. Ponieważ wszystkie próbki znajdowały się w łaźni

wodnej z termoregulacją, utrzymywano jednakową temperaturę i wilgotność w serii na świetle i w ciemności.

Wyniki z dwóch doświadczeń, w których dawano różną dawkę boru, zilustrowano na ryc. 4.

Z przedstawionego wykresu wynika, że wpływ boru różnił się w zależności od oświetlenia. W ciemności dodatek tego mikroelementu nie zmieniał (lub b. nieznacznie zmniejszał) absorpcji, natomiast na świetle, również nieznacznie, zwiększał. Różnice w absorpcji S i SB zarówno na świetle, jak i w ciemności, są nieudowodnione, natomiast różnice między kombinacjami SB światło i SB ciemność są udowodnione przy $P = 0,05$ w doświadczeniu z dn. 7.II. Przedział ufności dla tych kombinacji wynosi 8,65, a błąd $\mu_x = 3,76$.

Tabela 5

Wpływ różnych dawek boru na absorpcję sacharozy przez epidermę cebuli
Absorpcja w mg cukrów na 1 g św. m. epidermy 30.I.58

Roztwory	Powtórzenia				Średnio
	I	II	III	IV	
50/0 sacharoza	34,68	31,69	36,70	36,08	34,79*
50/0 sacharoza +10 mg B/l	35,95	42,20	50,29	55,72	46,04*
50/0 sacharoza +50 mg B/l	49,22	38,59	53,26	45,16	46,56*

* Przedział ufności = 10,1.

Błąd dośw. $\mu_x = 4,48$.

W doświadczeniu z dn. 24.I przebieg absorpcji jest bardzo podobny; tu również największe różnice widać między kombinacjami SB światło i SB ciemność, jednak nie są one udowodnione statystycznie ze względu na dużo większy błąd doświadczenia $\mu_x = 6,27$. Pozostałe różnice w obu doświadczeniach leżą w granicach błędu doświadczeń. Następne doświadczenia przeprowadzono w ciemności stosując dawkę 10 i 50 mg B/l. Chodziło o uzyskanie dodatkowych danych, jak wpływa bor na absorpcję sacharozy. W tym doświadczeniu udowodniono wpływ boru przy obu dawkach przy $P = 0,05$ i nie stwierdzono różnic pomiędzy dawkami B, co uwidocznione jest w tabeli 5.

Tabela 6

Wpływ boru na absorpcję sacharozy przez epidermę cebuli
(w mg cukrów na 1 g świeżej masy)

14.II.58

Roztwór	Powtórzenia						Średnia
	I	II	III	IV	V	VI	
50/0 sacharoza	23,81	26,18	11,02	27,17	18,79	23,31	21,71
50/0 sacharoza +50 mg B/l	17,26	20,64	24,47	11,71	17,64	16,01	17,75

Błąd dośw. $\mu_x = 3,01$.

Ponieważ wyniki tego doświadczenia nie pokrywają się z poprzednimi danymi, przebadano ponownie wpływ boru w ciemności, stosując 50 mg B/l roztworu. Doświadczenie wykonano w 6 powtórzeniach, lecz nie stwierdzono wpływu boru na absorpcję sacharozy. Wyniki zebrano w tabeli 6.

W następnym doświadczeniu sprawdzono, czy bor nie wpływa na przenikanie cukrów z komórki do wody podczas 15 minut płukania. W tym celu przeanalizowano wodę po 15 minutach kąpieli. Diagramy na ryc. 5 wskazują na niemal

Ryc. 5. Wpływ boru na absorpcję i desorpcję sacharozy z epidermy *Allium cepa*

Desorpcja: zawartość cukrów w wodzie po 15 min kąpieli, przeliczona na 1 g świeżej masy łusek płukanych. A — po epidermie zanurzonej w 5% sacharozie; B — po epidermie zanurzonej w 5% sacharozie + 50 mg B/l. Absorpcja: C — epiderma zanurzana w 5% sacharozie, D — epiderma zanurzona w 5% sacharozie + 50 mg B/l Graph 6

The influence of boron on the absorption and desorption of sucrose from the epidermis of *Allium cepa*

Desorption: the content of sugars in water after 15 minutes bath calculated into 1 g of washed epidermis A — after immersion in 5% sucrose; B — after immersion in 5% sucrose + 50 mg B/l. Absorption: C — epidermis immersed in 5% sucrose; D — epidermis immersed in 5% sucrose + 50 mg B/l

identycznie przebiegający proces wymywania cukrów w obu kombinacjach. W epidermie cebuli z kombinacji S i SB stwierdzono zbliżoną absorpcję w obu przypadkach. Analiza wody po płukaniu również nie pozwala wnioskować o różnej przepuszczalności plazmy przy wprowadzeniu boru do komórek.

WPLYW FOSFORANÓW NA ABSORPCJĘ SACHAROZY

Przebadano wielkość absorpcji sacharozy z roztworu, do którego dodawano różne fosforany. Zastosowana metodyka w niczym nie odbiegała od opisanej poprzednio w doświadczeniach metodycznych. Epidermę zanurzano w następujących roztworach:

woda

woda + $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,1 g P w 100 ml)

woda + 50% sacharoza

woda + 50% sacharoza + $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,1 g P w 100 ml)

Liczy zestawiono w tabeli 7.

Tabela 7

Wpływ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ na absorpcję sacharozy przez epidermę cebuli
(w mg cukrów na 1 g świeżej masy) 29.I.58

Roztwór	Powtórzenia				Średnio
	I	II	III	IV	
50/0 sacharoza	30,39	30,87	34,19	42,76	34,55
50/0 sacharoza + 0,50/0 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	24,77	23,27	—	—	24,02

Z tych danych wynika, że dodatek NaH_2PO_4 do 50/0 sacharozy obniża ilość zaadsorbowanych cukrów. Ponieważ jednak mamy tu tylko dwa powtórzenia tej kombinacji, na ich podstawie nie można opierać żadnych pewnych wniosków. Dlatego też powtórzono analogiczne doświadczenie stosując fosforan potasu i wapnia. Do doświadczeń przygotowano 6 różnych roztworów:

	pH
woda	5,5
50/0 sacharoza	5,5
woda + $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	— 0,05 g P na 100 ml — 3,2
50/0 sacharoza + $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	— 0,05 g P na 100 ml — 3,2
woda + KH_2PO_4	— 0,05 g P na 100 ml — 4,6
50/0 sacharoza + KH_2PO_4	— 0,05 g P na 100 ml — 4,5

Obawiając się zbyt dużego wzrostu wartości osmotycznej stosowanych roztworów, wprowadzono — jak widać z powyższych liczb — dwukrotnie mniejszą ilość P(0,05 g P na 100 ml zamiast 0,1 g P na 100 ml.)

Tabela 8

Wpływ KH_2PO_4 i $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ na absorpcję sacharozy
przez epidermę cebuli

(w mg cukrów na 1 g świeżej masy)

4.II.58

Roztwór	Powtórzenia				Średnio
	I	II	III	IV	
50/0 sacharoza pH = 5,5	24,03	31,23	40,57	37,90	33,43
50/0 sacharoza + KH_2PO_4 pH = 4,5	19,93	23,65	39,44	18,58	25,40
50/0 sacharoza + $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ pH = 3,2	10,31	19,76	16,71	9,79	14,14*

* Przedział ufności = 13,5.

Błąd dośw. μ_x = 6,1.

Tabela 8 ilustrująca absorpcję sacharozy w poszczególnych kombinacjach wskazuje na istotne różnice w kombinacji z fosforanem wapnia. Różnice spowodowane dodatkiem fosforanu potasu nie są udowodnione statystycznie, jednak

przejawia się tu taka sama prawidłowość jak w doświadczeniu poprzednim, niezależnie od obniżonej dawki fosforu.

Nieznaczne obniżenie absorpcji spowodowane obecnością fosforanów nie jest raczej uwarunkowane wpływem tych soli na intensywność oddychania. Wynika to z porównania zawartości cukrów w próbkach zanurzonych w wodzie (średnio 32,24 mg na 1 g świeżej masy) i w wodzie z dodatkiem fosforanów (średnio 30,27 mg na 1 g św. masy). W doświadczeniu, w którym stosowano NaH_2PO_4 , analogiczne różnice pomiędzy średnimi nie przekraczały 2 mg na 1 g świeżej masy skórek.

By sprawdzić, w jakim stopniu wyniki uwarunkowane są niejednakowym pH roztworów, przeprowadzono doświadczenie, w którym doprowadzono do zbliżonego pH przy pomocy 0,1 n KOH (stosunek wagowy $\text{Ca} : \text{K} = 32 : 5,4$). Zawartość P wynosiła 0,05 g na 100 ml jak w doświadczeniu poprzednim.

Roztwór z KH_2PO_4 również zalkalizowano 0,2 ml 0,1 n KOH doprowadzając do $\text{pH} = 5,5$. Dla kontroli i w tym doświadczeniu zachowano kombinację z $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ o $\text{pH} = 3,1$. Wyniki zebrane są w tabeli 9.

T a b e l a 9
Wpływ KH_2PO_4 i $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ na absorpcję sacharozy
(w mg cukrów na 1 g świeżej masy)

Roztwór	Powtórzenia				Średnio
	I	II	III	IV	
50/0 sacharoza, $\text{pH} = 5,5$	10,87	15,57	15,94	27,76	17,53
50/0 sacharoza + KH_2PO_4 zuboż. do $\text{pH} = 5,1$ przy pomocy KOH	13,91	8,01	12,71	17,80	13,11
50/0 sacharoza + $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ zuboż. KOH do $\text{pH} = 5,1$	8,48	10,02	7,55	6,28	8,08
50/0 sacharoza + $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $\text{pH} = 3,1$	7,45	4,72	8,71	8,11	7,25

Przedział ufności = 6,60.

Błąd dośw. μ_{K} = 3,03.

Jak widać, niezależnie od wartości pH, cukry w obecności $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ przenikają do komórek w znacznie mniejszych ilościach, co zostało udowodnione przy $P = 0,01$. I tym razem obecność fosforanu potasu nieznacznie osłabiła absorpcję, choć różnice nie są statystycznie udowodnione ze względu na duży błąd doświadczenia.

DYSKUSJA

Doświadczenia, z których chcemy wnioskować o wpływie jakiegoś czynnika na przepuszczalność plazmy, są niezmiernie trudne do interpretacji. Wynika to

przede wszystkim z rozbieżnych poglądów na temat samej przepuszczalności. Dziś coraz rzadziej mówi się o przepuszczalności w klasycznym ujęciu, bez uwzględniania charakteru danego związku i sił warunkujących jego przenikanie do komórki. Zamiast statycznego pojęcia przepuszczalności coraz częściej mówi się o transporcie aktywnym danej substancji lub o jej biernym przenikaniu przez plazmę głównie na zasadzie dyfuzji.

Stern 1949 (wg Kramera) przypuszcza, że decydującym czynnikiem przy przenikaniu związków są nie fizyczne własności błony komórkowej i plazmatycznej, nie porowatość ani nawet nie struktura chemiczna, lecz raczej metaboliczny charakter towarzyszący temu procesowi.

Przenikanie sacharozy do komórki zachodzi najprawdopodobniej stopniowo, w trzech zasadniczych fazach:

1. Bierny ruch cząsteczek poprzez błonę komórkową do powierzchni protoplazmy (tu dużą rolę odgrywa najprawdopodobniej dyfuzja).
2. Pokonanie oporu, jaki stawia plasmolema.
3. Aktywny transport sacharozy przez mezoplazmę i tonoplast. Te 2 fazy ruchu wymagają nakładu energii pochodzącej z procesu oddychania i odbywają się, być może, przy udziale specjalnych nośników (carrier).

By móc odpowiedzieć na postawione w pracy pytanie, jak wpływa bor i fosfor na przenikanie sacharozy do komórek epidermy cebuli, należałoby przebadать tylko drugą i trzecią fazę ruchu. Niestety takie badania nastroczają poważne trudności, często nie do pokonania. Dlatego też, by ocenić wyniki przedstawione powyżej, należy przeanalizować, jaki charakter ma absorpcja opisana w tych doświadczeniach i czy mamy tu prawo mówić o aktywnym przenikaniu sacharozy.

Fizyczny proces absorpcji przebiega gwałtownie w pierwszych minutach, po czym szybko słabnie i dalszego wzrostu nieomal się nie obserwuje. Krzywa absorpcji ma charakter krzywej logarytmicznej. Pierwszy etap pobierania składników mineralnych odbywa się na drodze adsorpcji. Kielki pszenicy umieszczone w roztworze octanu ołowiu w ciągu 10 minut adsorbowały 2/3 tej ilości soli, którą nagromadziły w ciągu 22 godzin (Sabinin 1934, Kołosow 1935 wg Sabinina). Adsorpcja nie zależy też od temperatury (Sabinin 1955).

Tymczasem na podstawie własnych doświadczeń stwierdzono wyraźny wpływ temperatury na gromadzenie sacharozy w epidermie cebuli. Wynika to nie tylko ze wzmożonego oddychania. Wyższa temperatura powoduje też zmiany w samej strukturze plazmy (zmiana lepkości, szybsze ruchy Browna). Niezależnie od tego jak należy interpretować wzmożoną absorpcję w wyższej temperaturze, wskazuje ona na aktywny proces przenikania sacharozy do epidermy.

Na rycinie 3 punkt ilustrujący absorpcję po 15 minutach jest nieco przesunięty ku górze na skutek dużego odskoku jednego z powtórzeń. Dlatego też pozornie absorpcja po 1 godzinie jest mniejsza niż po 15 minutach, co leży w granicach błędu. W ciągu dalszych godzin absorpcja nadal wzrasta, lecz bardzo nieznacznie. Tłumaczy to częściowo fakt, że cukry nagromadzone w komórkach

epidermy nigdzie nie są przemieszczane i dlatego następuje zahamowanie, a przynajmniej zwolnienie dalszego ich pobierania. Tym niemniej duża absorpcja w ciągu pierwszych minut (ok. 70% cukrów pobranych w ciągu 4 godzin) nasuwa przypuszczenie o podobieństwie opisywanego procesu do procesu adsorpcji lub sorpcji wymiennej, która zdaniem Sabinina jest pierwszym etapem pobierania składników mineralnych. Z drugiej strony wydaje się, że przenikanie cukru w opisanych doświadczeniach jest procesem bardziej złożonym, gdyż skórki zanurzone na 15 minut w roztworze sacharozy, a następnie poddawane 15-min. kąpeli zatrzymywały znaczne ilości cukrów, pomimo jednakowego czasu absorpcji i desorpcji.

Duża absorpcja obserwowana w pierwszych 15 minutach nasuwa przypuszczenie, że niemalą rolę w obserwowanym tu zjawisku odegrała pierwsza faza biernego przenikania cukrów. Świadczy o tym ogromna absorpcja obserwowana w początkowych doświadczeniach, w których epidermy nie poddawano 15 min. kąpeli. Wówczas dominujący udział w ogólnej absorpcji miała najprawdopodobniej adsorpcja powierzchniowa w mikrokapilarach błon komórkowych oraz na strzępkach porożywanej tkanki mięksisowej.

Zagadnienie wpływu światła na przepuszczalność plazmy nie jest jednoznacznie przedstawiona w literaturze. Obok wielu autorów (Hoagland 1924, Lepeschkin 1930, Phillis i Mason 1937), którzy stwierdzili wzrost przepuszczalności plazmy dla różnych substancji na świetle, Weatherley (1954) dochodzi do odmiennych wniosków. Badając absorpcję sacharozy przez dyski z liści w warunkach jednakowej temperatury i wilgotności, w ciemności i na świetle, nie stwierdził żadnych istotnych różnic.

W niniejszej pracy nie stwierdzono wpływu światła na przenikanie cukrów do epidermy cebuli. Być może, że zatarły się one przez duży błąd doświadczenia. Różnice stwierdzono jedynie przy łącznym działaniu światła i boru, w porównaniu bor-ciemność, choć biologicznie jest to trudne do wyjaśnienia. Być może, w naszych doświadczeniach zbyt mało dochodziło do badanych tkanek promieni ultrafioletowych i fioletowych, które zdaniem Lepeschkina w największym stopniu wpływają na przepuszczalność plazmy.

Rola boru w przemieszczeniu i absorpcji cukrów w literaturze interpretowana jest bardzo różnie. Nie wszyscy autorzy potwierdzają wpływ boru na przemieszczanie cukrów. Skok (1957) prowadząc doświadczenia na słoneczniku nie potwierdził doświadczeń Gaucha, Duggera i innych.

Z zestawienia literatury dotyczącej fizjologicznej roli boru w przemieszczaniu związków organicznych wynika, że jest tu dużo problemów niejasnych i sporo sprzecznych faktów. Być może, że obserwowany w niektórych doświadczeniach wpływ tego mikroelementu jest przejawem wtórnego oddziaływania poprzez inne procesy fizjologiczne. Świadczy o tym pośrednio ogromna ilość procesów, na które wpływa ten mikroelement. Ponadto niejednoznaczne wyniki mogą też być spowodowane różną metodyką badań, tak ważną w zagadnieniach przepuszczalności plazmy.

Obniżona absorpcja sacharozy pod wpływem $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ jest najprawdopodobniej spowodowana zwiększeniem lepkości plazmy pod wpływem jonów wapnia. Niejasne jest natomiast, dlaczego dodatek fosforanów sodu i potasu powoduje ten sam efekt, choć znacznie słabiej wyrażony. Świadczy to, być może, o pośrednim wpływie fosforanów lub dodatku soli mającej pewną wartość osmotyczną na pobieranie cukrów. Podobne osłabienie absorpcji cukrów (glukozy) w obecności związków nieorganicznych P u siewek pszenicy zaobserwowali Vittorio P. V., Krotkow O, Reed G. B. (1955). Nasze wyniki mógł modyfikować fakt, że cebula do doświadczeń pochodziła z urodzajnej, dobrze zaopatrzonej w fosfor gleby. Dzięki temu w komórkach epidermy mogła znajdować się dostateczna ilość fosforanów koniecznych do przemian metabolicznych. Przeglądając wyniki w poszczególnych tabelach, widać dużą zmienność absorpcji w różnych doświadczeniach. Zauważono, że cebula, brana do doświadczeń w końcu lutego, w marcu miała coraz mniejszą zdolność pobierania cukrów. Analogicznie do spadku zdolności absorpcyjnej malała zawartość cukrów w skórce.

STRESZCZENIE I WNIOSKI

Przebadano absorpcję sacharozy przez epidermę cebuli. W większości doświadczeń łuski cebuli zanurzano w 50% roztworze sacharozy na okres 4 godzin, w temperaturze 30°C. Stwierdzono, że absorpcja wzrasta niemal dwukrotnie przy podwyższeniu temperatury z 10 do 30°C. W ciągu pierwszych 15 minut przenikało do komórek około 70% cukru w stosunku do ilości, którą stwierdzono po 4 godzinach. Te dwa wyniki doświadczeń wskazują na trudności w interpretacji tego typu badań. Jest tu brak dostatecznej ilości kryteriów pozwalających obserwowaną absorpcję sacharozy zaliczyć do procesu aktywnego.

Przeprowadzono doświadczenia, w których do roztworu sacharozy dodawano bor, fosforan wapnia, potasu i sodu. W większości doświadczeń nie stwierdzono wpływu boru na wielkość absorpcji i desorpcji cukrów. Natomiast fosforan wapnia wyraźnie utrudniał przenikanie cukru do komórek epidermy. Podobna prawidłowość występuje pod wpływem fosforanu potasu i sodu. Nasuwa to przypuszczenie, że ujemny wpływ na przenikanie cukru ma albo anion (fosforan), albo kation, a w danym przypadku wapń, albo obecność samej soli mającej pewną wartość osmotyczną. To zagadnienie jednak jest nadal niejasne i wymaga dalszych badań.

W świetle niniejszej pracy wydaje się, że we wszystkich doświadczeniach dotyczących przenikania jakichkolwiek związków do żywych komórek należy bardzo dokładnie scharakteryzować dany proces, gdyż często na skutek nieostrożnej interpretacji można dojść do krańcowo rozbieżnych wniosków.

Pani prof. dr H. Bireckiej serdecznie dziękuję za cenne wskazówki. Kol. mgrowi J. Tarłowskiemu dziękuję również za pomoc okazaną mi w czasie wykonywania pracy.

SUMMARY

The absorption of sucrose by onion epidermis was examined. In most of the experiments the epidermis were immersed in a 50% solution of sucrose for a period of 4 hours. Then they were superficially rinsed and kept in a water bath for 15 minutes for desorption of sugars which had not penetrated into the protoplasm. Absorption was calculated from the difference of sugars content in epidermis put into sucrose and water.

A definite influence of temperature was observed (with the increase of temperature from 10° to 30°C absorption was almost doubled). The dependence of absorption on temperature proves a close connection of the investigated process with cell metabolism.

In investigating the absorption dynamics of sucrose it was observed that during the first 15 minutes about 70% of sugars, in relation to the quantity which was observed after 4 hours, penetrated into the cells. This may lead to the supposition that the observed process is reminiscent of physical absorption or exchange sorption. The adsorption of sugars on the surface of cell walls and in the microcapillaries of these walls probably takes place during the first few minutes. The greater part of the sugars is then washed out during 10—15 minutes in the water bath.

The results of these two experiments point out the difficulties of interpretation in this kind of work. It is difficult to establish a sufficient criterion for distinguishing whether the examined absorption of sucrose consists in active and not passive transport.

In a number of experiments H_3BO_3 was added to the solution of saccharose and to water in amounts of 10 or 50 mg B to the litre. In most experiments no definite influence of this microelement was observed either on the absorption or on the desorption of saccharose.

The addition of $Ca(H_2PO_4)_2$ distinctly lowered the absorption of sucrose both when pH = 3.1 and when pH = 5.1. Potassium and sodium phosphate showed a similar influence but much more weakly and this was not proved statistically. It may be supposed that the active factors are either cations (or at any rate calcium), phosphates, or merely the presence of salt which has a certain osmotic value.

The difference of opinions in literature on the influence of boron on the permeability of plasma and the influence of phosphorus on the absorption of sugars may be caused by the differences in experimental techniques which do not always account for the active transport of sugars.

LITERATURA

- Bonner J., Golston A. W., 1952, Principles of Plant Physiology.
Collander R., 1957, Annual Review of Plant Physiology 8: 335—348.
Danielli J. F., 1954, Active transport and secretion, Symposia of the society for experimental biology, VIII: 502—516, Cambridge Univ. Press.
Dugger W. M., Humphreys J. R., Calhoun B., 1957, Plant Physiol. 32: 364—370.
Dormer K. J., Street H. E., 1949, Annals of Botany 13 (49): 199—217.
Fujita Akiji, Danzo Iwatake, 1931, Biochem. Ztschrift. 242: 43—60.
Gauch H. G., Dugger W. M., 1953, Plant physiol. 28 (13): 457—466.

- Gauch H. G., Dugger W. M., 1954, The physiological action of boron in higher plants: a review and interpretation.
- Harley J. L., Smith D. S., 1956, *Annals of Botany* 20 (80): 513—543.
- Hoagland D. R., Davis A. R., 1924, *Juorn. of general physiol.* 6: 46—62.
- Johnson E. S., Fisher P. L., 1930, *Plant physiol.* 5: 387—392.
- Kramer P. J., 1956, *Handbuch der Pflanzenphysiologie* 2: 358—367 (Ruhland).
- Lepeschkin W. W., 1930, *American Journ. of Botany* 17 (10): 953—970.
- Mitchell J. W., Dugger W. M., Hugh Gauch, 1953, *Science* 118 (3065): 354—355.
- Mc Ilrath W. J., Palser B. F., 1955, *Plant Physiology*, Supplement 30.
- Nelson C. D., 1956, *Plant Physiology*, Supplement 31.
- O'Kelley J. C., 1957, *American Journal of Botany* 44: 239—244.
- Phillis E., Mason T. G., 1937, *Annals of Botany* 1: 231—237.
- Rothstein A., 1954, Active transport and secretion, *Symposia of the society for experimental biology*, VIII: 165—202, Cambridge Univ. Press.
- Robertson R. N., 1956, *Handbuch der Pflanzenphysiologie* 2: 449—467 (Ruhland).
- Sabinin D. A., 1955, *Fizjologiczeskije osnovy pitanija rastenij*, Moskwa.
- Säid H., 1948, *Nature* 162, 496.
- Sisler E. S., Dugger J. R., Hugh Gauch, 1956, *Plant Physiol.* 31: 11—17.
- Street H. E., Lowe J., 1950, *Annals of Botany* 55: 307—329.
- Skok J., 1957, *Plant Physiology* 32: 308—312.
- Steinbach H. B., 1951, *Annual Review of Plant Physiology* 2: 323—342.
- Starck R., 1955, *Acta Soc. Bot. Pol.* 24 (3): 675—691.
- Szkołnik M., 1950, *Znaczenie mikroelementow w zizni rastenij i w ziemledielii*, Moskwa, Leningrad, Izd. Ak. Nauk SSSR.
- Vittorio P. V., Krotkov., Reed G. B., 1955, *Biol. Abstract* 29694 vol. 29 (3).
- Weatherely P. E., 1953, *New Phytologist* 52: 76—80.
- Zittle C. A., 1951, *Advances in enzymology* 12: 493—527.
- Zeigler H., 1956, *Planta* 47: 447—500.