Wpływ światła na syntezę tokoferoli u *Zea mays* L. w początkowym okresie wzrostu

*The influence of light on the synthesis of tocopherols in Zea mays L.
seedlings*

T. BASZYŃSKI

Występowanie tokoferoli u roślin było przedmiotem licznych prac, jednak badania nad wyjaśnieniem ich fizjologicznej roli w życiu roślin nie były prawie podejmowane. Przyczyn braku zainteresowania tym zagadnieniem należy szukać między innymi w trudnościach, na jakie napotykali badacze w oznaczaniu tych związków. Znaczny postęp techniki oznaczania tokoferoli w ostatnich latach, a zwłaszcza zastosowanie chromatografii bibułowej (Brown F. 1952a, 1952b, Eggitt Russell P. W., Ward L. D. 1953, Green J., Marcinkiewicz S., Watt P. R. 1955) do rozdziału poszczególnych „izomerów“, pozwala pokonać te trudności i zainteresować się bliżej tymi ważnymi i ciekawymi zarówno z naukowego, jak i praktycznego punktu widzenia związkami.

Synteza tokoferoli w roślinach nie jest jeszcze dostatecznie poznana. Występowanie ich wspólne z barwnikami plastydowymi oraz pewne strukturalne podobieństwo tych związków pozwala przypuszczać, że tworzenie się tokoferoli pozostaje w pewnym stosunku do tych barwników.

Zacharowa (1954) prowadząc badania nad tworzeniem się i lokalizacją tokoferoli wykazała przeciwny charakter ich syntezy w porównaniu z chlorofilem i karotenoidami, zwłaszcza po osiągnięciu ich maksymalnego nagromadzenia. W toku badań doszła do wniosku, że nasilenie biosyntezy tokoferoli w czasie wegetacji uzależnione jest od uwalnianego alkoholu fitolu podczas rozpadu chlorofilu, czyli że ilość zawartych w roślinie tokoferoli zależy od zatrzymania konkurencyjnych procesów biosyntezy karotenu i chlorofilu. Nie odnosi się to do wczesnego okresu wzrostu, bowiem obserwacje wpływu światła na zawartość po-

wyższych związków przeprowadzone przez Zacharow^ą na siewkach grochu i owsa wykazały, że:

1) intensywna synteza tokoferoli zachodzi nawet w ciemności, kiedy nie występują jeszcze chlorofil i karoten (na tej podstawie opiera przypuszczenie o prawdopodobnym tworzeniu się fitolu w tych warunkach).

2) światło stymuluje tworzenie się wszystkich trzech badanych związków, przy czym nie daje się zaobserwować między nimi żadnych konkurencyjnych stosunków.

Uwzględniając przypuszczenie Godniew^a o syntezie fitolu z łańcucha karotenoidowego na drodze odbudowy i przeciwstawny mu pogląd Karrera, że karotenoidy tworzą się na drodze odwodorowania i kondensacji fitolu, Zacharow^a opowiada się za pierwotną syntezą fitolu.

Fischer i Bohn (1958) badając warunki tworzenia się fitolu nie stwierdzili go w etiolowanych kielkach kukurydzy i jęczmienia (które, jak wiadomo, stanowią poważne źródło tokoferoli) w przeciwieństwie do kielków rosnących na świetle, w których znaleźli ok. 0,3 mg fitolu w 1 g świeżej masy. Dochodzą stąd do wniosku, że synteza fitolu w chloroplastach obydwu badanych roślin wymaga tak samo światła, jak synteza chlorofilu. Dla potwierdzenia tego poglądu podają, że kielkująca na świetle kukurydza w swoich niezielonych organach (kielki, korzenie) nie zawierała fitolu. Tworzenie się fitolu we wszystkich badanych przypadkach występowało tylko wtedy, gdy zachodziła synteza chlorofilu. Jest rzeczą interesującą, że siewki kukurydzy rosnące na sztucznym świetle, mimo że były zielone, zawierały więcej fitolu, niż by to wynikało z ilości chlorofilu obecnego w roślinie. Tymi „nadwyżkami fitolowymi“ w stosunku do chlorofilu starają się autorzy wytłumaczyć w pewnym stopniu syntezę tokoferoli czy też witaminu K₁. Wyniki Fischera i Bohna mają znaczenie dla potwierdzenia zaobserwowanej przez Zacharow^ą zwiększonej syntezy tokoferoli na świetle, jednak nie dają podstaw do poparcia jej przypuszczenia, jakoby tworzenie się tokoferoli w ciemności było konsekwencją intensywnej syntezy fitolu w tych warunkach.

Stosowana przez Zacharow^ą metoda oznaczania tokoferoli nie pozwalała na ustalenie udziału poszczególnych tokoferoli w ich syntezie. Ważną jednak sprawą jest stwierdzenie jakie spośród siedmiu znanych tokoferoli tworzą się w kielkujących nasionach w początkowym okresie vegetacji. Brown (1952a) wykazał, że zielone części kilku roślin z rodziny Gramineae zawierają wyłącznie α -tokoferol, podczas, gdy powszechnie wiadomo, iż nasiona i oleje większości dotychczas przebadanych roślin nie zawierają α -tokoferolu wcale albo w znikomych ilościach, natomiast inne tokoferole stanowią znaczny procent ogólnej ich sumy. Można by

przezo przyjąć, że w okresie kiełkowania powinno zachodzić przegrupowanie w ilościowym, a być może i jakościowym składzie tokoferoli.

W świetle cytowanych prac wydało nam się słuszne przy zastosowaniu dokładniejszych metod oznaczania:

1) sprawdzenie wpływu ciemności i światła na syntezę tokoferoli w najwcześniejszym okresie wzrostu rośliny,

2) prześledzenie jakościowego i ilościowego składu tokoferoli podczas pierwszych dni wzrostu,

3) zbadanie wzajemnego stosunku tokoferoli, karotenoidów i chlorofilu w tym okresie.

Przy okazji przebadano również rozmieszczenie tokoferoli w nasionach *Zea mays* L., które były obiektem naszych badań, oraz niektóre ich własności, co może mieć pewne znaczenie praktyczne.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Materiał i metody

Do doświadczeń wybrano nasiona *Zea mays* L. (odmiana złota górecka) pochodzące ze stacji Hodowlano-Badawczej IHAR Smolice. Przed przystąpieniem do doświadczeń nad kiełkującymi nasionami przeanalizowano materiał wyjściowy. Analizowano całe nasiona, a także wydzielone z nasion zarodki i bielmo. Materiał po oddzieleniu zarodków mielono w młyn-

Tabela 1

Analiza nasion *Zea mays* L. Analysis of *Zea mays* L. seeds

Próbka Sample		Wilgotność % Moisture	Ekstrakt eterowy % Ether extract	Azot ogólny % Nitrogen	Suma tokoferoli w $\mu\text{g/g s.m}$ Total tocopherol $\mu\text{g/g}$ dry weight
Kukurydza maize	ziarno grain	10,9	5,8	1,38	46,4
	zarodek embryo	7,8	41,1	2,24	166,5
	mąka flour	11,1	1,4	1,19	7,2
	otręby bran	11,2	1,1	1,40	56,4

T a b

Zawartość tokoferoli, karotenoidów
Content of tocopherols, carotenoids and

Dni wzrostu Growth period days		Sucha masa 0/0 Dry matter	T o k o f e r o l e T o c o p h e r o l s								
			na g świeżej masy per g of fresh weight				na g s. m. per g of dry weight	w 10 siewkach in 10 seedlings			
			α		γ		suma total	suma total	α	γ	suma total
			μg	0/0	μg	0/0	μg	μg	μg	μg	μg
Ciemność — dark											
2	48,8	8,3 $\pm 0,79$	11,0	66,9 $\pm 0,65$	89,0	75,2	153,7	1,4	11,2	12,6	
3	28,6	5,6 $\pm 0,11$	12,2	41,0 $\pm 0,76$	87,8	46,0	160,8	1,4	10,3	11,7	
4	15,0	6,0 $\pm 0,15$	23,2	19,9 $\pm 0,76$	76,8	26,1	173,3	3,2	10,8	14,8	
5	12,3	5,4 $\pm 0,15$	34,0	10,5 $\pm 0,69$	66,0	15,9	129,3	5,4	10,5	15,9	
7	12,2	2,5 $\pm 0,11$	38,0	4,1 $\pm 0,08$	62,0	6,6	54,1	5,7	9,4	15,1	
Światło — Light											
2	49,2	9,0 $\pm 0,80$	11,2	71,6 $\pm 1,04$	88,6	80,6	184,1	1,6	12,3	13,9	
3	35,4	8,3 $\pm 0,29$	14,5	48,9 $\pm 0,40$	85,5	57,2	161,4	2,4	13,9	16,3	
4	20,7	4,6 $\pm 0,14$	19,5	19,0 $\pm 0,57$	80,5	23,6	114,0	3,5	14,6	18,1	
5	15,0	4,4 $\pm 0,18$	32,4	9,2 $\pm 0,65$	67,6	13,6	90,7	6,3	13,1	19,4	
7	16,4	2,7 $\pm 0,10$	42,2	3,7 $\pm 0,09$	57,8	6,4	39,0	9,6	13,2	22,8	

ku, po czym rozrarte bielmo przesiewano przez sito otrzymując 50% mąkę i otręby.

W celu otrzymania kiełków mociono nasiona przez 24 godziny w wodzie, a następnie wykładano po 25 nasion w szalkach Petriego na ligninę zwilżoną 50 ml pożywki Hampe i Truffaut i umieszczano w termostacie o temperaturze $28^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Dla utrzymania stałej wilgotności dodawano do kultury w międzyczasie wody. Kiełkowanie

cia 2

i chlorofilu w siewkach *Zea mays* L.
chlorophylls in *Zea mays* L. seedlings.

K a r o t e n o i d y w μg C a r o t e n o i d s i n μg						C h l o r o f i l w μg C h l o r o p h y l l i n μg						a/b
na g świeżej masy per g of fresh weight		na g suchej masy per g of dry weight		w 10 siewkach in 10 seedlings		na g świeżej masy per g of fresh weight		na g suchej masy per g of dry weight		w 10 siewkach in 10 seedlings		
karoten carotene	ksantofil xanthophyll	karoten carotene	ksantofil xanthophyll	karoten carotene	ksantofil xanthophyll	a	b	a	b	a	b	
	ś l a d y t r a c e											
	ś l a d y t r a c e											
0,5 ± 0,12	1,4 ± 0,05	3,7	11,3	0,5	1,4							
0,8 ± 0,04	6,0 ± 0,05	6,3	49,3	1,8	13,7							
	ś l a d y t r a c e											
0,4 ± 0,02	1,9 ± 0,01	1,1	5,4	0,1	0,5		ś l a d y t r a c e					
1,2 ± 0,07	5,2 ± 0,02	5,8	25,1	0,9	4,0	72,0 ± 0,17	25,0 ± 0,71	356,8	123,8	55,4	19,2	2,7
4,1 ± 0,17	13,0 ± 0,09	27,3	86,7	5,9	18,6	198,0 ± 2,95	68,0 ± 2,79	1320,0	563,3	286,0	97,0	2,9
2,9 ± 0,15	35,5 ± 0,24	78,7	216,5	46,1	126,8	368,0 ± 5,04	137,0 ± 1,29	2243,9	835,4	1307,0	489,0	2,7

następowało po około 24 godzinach od czasu umieszczenia nasion w termostacie.

W pierwszej serii doświadczeń, dotyczącej wpływu światła na syntezę tokoferoli kielki oświetlane były żarówką Helios 300 W z odległości 2 m, w ciągu 12 godzin na dobę. Materiał do analiz z tej serii brano każdorazowo bezpośrednio po okresie oświetlania.

W drugiej serii doświadczeń etiolowane kielki trzymano w zupełnej

ciemności i tylko podczas dodawania wody w celu utrzymania odpowiedniej wilgotności zapalano na bardzo krótki czas ciemnozielone światło.

Obydwie serie doświadczeń prowadzono w ciągu siedmiu dni. W tym czasie wyrastające w ciemności rośliny osiągały długość około 8 cm, u niektórych z nich pojawiały się liście. Rosnące na świetle miały w ostatnich dniach doświadczeń około 5 cm długości i dwa wykształcone liście.

Po upływie 2, 3, 4, 5 i 7 dni oddzielano roślinę od nasienia, krojono skalpelem na drobne kawałki, a po wymieszanu brano bezzwłocznie średnią próbkę do oznaczenia suchej masy. Inną część materiału analizowano na zawartość tokoferoli, karotenoidów i chlorofilu.

Oznaczanie tokoferoli: Próbkę materiału roślinnego, w ilości odpowiadającej około 500 μg tokoferoli, rozcierano dokładnie w moździerzu z metanolem i przenoszono do kolbki. Następnie zmydlano na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną 2 n alkoholowym roztworem KOH w obecności pirogallolu, w temperaturze 70°C, w ciągu 30 minut w atmosferze azotu. Nie zmydloną frakcję rozpuszczoną w eterze naftowym chromatografowano na kolumnie wypełnionej ziemią rejdowiecką (śr. 1 cm, wys. 4 cm) aktywowaną według Glavinda, Kjølhede'a i Prange'a (cyt. Brown 1952a) i eluowano 20 ml 25% eteru etylowego w eterze naftowym. Otrzymany eluat oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozpuszczano w 1 ml benzenu. Przygotowany w ten sposób ekstrakt rozdzielano chromatograficznie metodą Greena i wsp. (1955). Rozwinięty chromatogram wywoływano 0,2% FeCl_3 w alkoholu absolutnym i 0,5% alkoholowym roztworem α, α' -dwupirydyli według Emmerie i Engela. Otrzymane plamy eluowano metanolem (modyfikacja Masona i Jonesa 1958). Pomiaru ekstynkcji dokonywano na fotometrze wizualnym Pulfricha, przy filtrze S 50. Krzywą wzorcową przygotowano z octanu dla α -tokoferolu, po uprzedniej hydrolizie kwasowej. Ilość γ -tokoferolu, z powodu braku czystego preparatu, obliczano również z tej samej krzywej. Plamy α - i γ -tokoferolu identyfikowane były na podstawie Rf. γ -Tokoferol ponadto traktowano roztworem dwuazo-o-dwuanyizydyny (roztwór przygotowany według sposobu Weislera i wsp. 1947). Zarówno α -, jak i γ -tokoferol dawały brązowe plamy po spryskaniu amoniakalnym roztworem AgNO_3 w metanolu.

Oznaczanie chlorofilu: Z roztartej w moździerzu tkanki roślinnej ekstrahowano barwniki acetonem tak długo, aż wyciąg acetonowy stał się bezbarwny. Ekstrakt acetonowy przenoszono do rozdzielacza, dodawano małą ilość eteru naftowego i wody, aby barwniki przeszły do eteru. Przemytą wodą destylowaną warstwę suszono małą ilością bezwodnego Na_2SO_4 i chromatografowano na kolumnie skrobiowej. Metodę

rozdziálu, jak również sposób określania chlorofilu a i b na fotometrze Pulfricha filtr S 61, przyjęto z pracy Więckowskiego (1957).

Oznaczanie karotenoidów: Karotenoidy oznaczano metodą chromatograficzną według Workera (1957) eluując zaabsorbowane karoteny 2% acetonem w eterze naftowym, a ksantofile 8% etanolem w eterze naftowym. Oznaczenia kolorymetryczne otrzymanych eluatów przeprowadzono na fotometrze Pulfricha stosując filtr S 47. Krzywą standardową sporządzono z czystego β -karotenu w eterze naftowym.

Azot ogólny w nasionach oznaczano metodą Kjeldahla, natomiast ekstrakcję eterową przeprowadzono w aparacie Soxhleta.

Wyniki analiz nasion podano w tabeli 1. Zawartość tokoferoli, karotenoidów i chlorofilu w siewkach zestawiono w tabeli 2. Przedstawione wyniki w odniesieniu do świeżej masy stanowią średnią arytmetyczną z czterech oznaczeń. Przy wynikach podano średni błąd średniej arytmetycznej. Inne wyniki przeliczono z powyższych otrzymanych z bezpośredniej analizy danych.

WYNIKI

Nasiona *Zea mays* L., będące obiektem badań, zawierały 46,4 μ g ogólnej sumy tokoferoli na 1 g s.m. Dużą zawartością tokoferoli odznaczały się zarodki stanowiące jednak tylko 11,5% ogólnej masy nasion. Znaczna część tokoferoli zlokalizowana jest w otrębach, mianowicie 56,4 g/1g s.m., mąka zaś zawiera 7,2 g/1g s.m. Zarodki ponadto zawierają znaczne ilości tłuszczu. Zawartość azotu w normie, u zarodków około dwukrotnie wyższa niż u reszty ziarna. Przy oznaczaniu tokoferoli w nasionach ograniczono się do podania ogólnej ich zawartości.

Etiolowane siewki kukurydzy zawierają tokoferole. Ilość ich w przeliczeniu na 10 siewek jest niższa aniżeli u rosnących na świetle. Wzrost zawartości tokoferoli u roślin etiolowanych w ciągu trwania doświadczenia nie jest duży, natomiast u roślin oświetlonych przewyższa 1,6-krotnie stan początkowy. U roślin rosnących w ciemności w ciągu pierwszych czterech dni zwiększa się ogólna zawartość tokoferoli w 1 g suchej masy, następnie wykazuje tendencję spadkową.

W badanym materiale stwierdzano wyłącznie α - i γ -tokoferole. Na chromatogramach obserwowano szereg plam pochodzących od nietokoferolowych substancji redukujących. W końcowym stadium doświadczeń w chromatogramach z eksponowanych na świetle roślin pojawiły się po zadaniu odczynnikami Emmerie i Engel słabo widoczne plamy wskazujące

na obecność η -tokoferolu. Pod wpływem dwuazo-o-dwuanizydyny barwiły się one na kolor czerwony. Identyfikację tych plam uniemożliwiał brak czystego η -tokoferolu. W czasie trwania doświadczeń procentowa zawartość poszczególnych tokoferoli ulega zmianie. α -Tokoferol wzrasta około czterokrotnie stanowiąc 38% w końcowym stadium doświadczeń w przypadku zaciemnionych roślin, a w przypadku oświetlonych 42,2% ogólnej sumy tokoferoli. γ -Tokoferol wykazuje spadek u roślin zaciemnionych, a dość duże wahania u rosnących na świetle.

U roślin pozostających w ciemności karotenoidy nie występują w pierwszych dniach po wykiełkowaniu. Pierwsze ślady tych związków obserwowano u siewek 3- i 4-dniowych. Większe ilości karotenoidów stwierdzono 5 dnia, w ostatnim dniu doświadczeń ilość ich jest już dość znaczna. Pośród badanych dwóch grup barwników karotenu i ksantofilu przeważał ten ostatni. W miarę upływu czasu ilość jego w stosunku do karotenu rosła. Stosunek ksantofilu do karotenu u siewek 5-dniowych wynosił 2,8, a po dwóch dniach wzrósł do 7,5.

Tworzenie się karotenoidów u roślin eksponowanych na świetle zaczyna się natychmiast i podnosi gwałtownie w czasie wzrostu. Stosunek ksantofilu do karotenu w miarę wzrostu roślin przesuwa się na korzyść karotenu. Jak wynika z tabeli 2 u 3-dniowych siewek wynosi on 4,8, a po czterech dniach spada do 2,8.

Równoległe z syntezą karotenoidów u roślin poddanych działaniu światła powstaje chlorofil, chociaż zawsze jego pojawienie poprzedzone było tworzeniem się lipochromów. Ilość chlorofilu wzrastała z wiekiem siewek. We wszystkich przypadkach ilość chlorofilu *a* była wyższa niż chlorofilu *b*. Stosunek chlorofilu *a* do *b* był mniej więcej stały i wynosił 2,7—2,9.

U roślin etiolowanych przez cały czas trwania doświadczeń chlorofilu nie stwierdzono.

Przyrost karotenoidów i chlorofilu wynikał zarówno z przeliczenia na świeżą i suchą masę, jak również z ich absolutnej ilości w odniesieniu do 10 roślin.

DYSKUSJA

Zawartość tokoferoli w analizowanych nasionach *Zea mays* L. jest niższa aniżeli otrzymana przez Masona i Jonesa (1958). Źródła rozbieżności naszych danych z wynikami Masona i Jonesa należy szukać poza różnicami odmianowymi, w odmiennych warunkach glebo-

wych, siedliskowych i klimatycznych Australii, skąd pochodził badany materiał. Interesujące jest wykrycie przez wspomnianych autorów w kukurydzy obok α - i γ -tokoferolu także ϵ -tokoferolu, podczas gdy dotychczas, nie biorąc pod uwagę sugerowanej przez nas obecności η -tokoferolu stwierdzano wyłącznie dwa pierwsze tokoferole.

Wyodrębnione z nasion zarodki odznaczają się dużą ilością tłuszczu. Stosowane dla podwyższenia jakości mąki kukurydzianej złuszczenie skórki i odrzucanie zarodka, ze względu na dużą w nich zawartość tokoferoli, obok wysokogatunkowego tłuszczu a także azotu, może mieć znaczenie praktyczne w konsumpcji i przemyśle.

Zaobserwowana przez Zacharową biosynteza tokoferoli w ciemności znajduje potwierdzenie w naszych wynikach, chociaż wzrost ten jest niewielki. Również wzrost tokoferoli w przeliczeniu na suchą masę w ciągu pierwszych czterech dni doświadczeń zgodny jest z jej wynikami.

Zwiększanie się procentowej zawartości α -tokoferolu w miarę wzrostu roślin, zarówno na świetle, jak i w ciemności jest interesującym zjawiskiem. Ten wzrost α -tokoferolu czyni zrozumiałym spostrzeżenie Browna (1952a), że u *Gramineae* występuje wyłącznie α -tokoferol, można bowiem mniemać, iż dalszemu rozwojowi rośliny towarzyszy dalszy wzrost α -tokoferolu.

Zwiększenie się zawartości α -tokoferolu u roślin rosnących w ciemności odbywa się prawdopodobnie na dwóch różnych drogach. Zmniejszanie się zawartości γ -tokoferolu, aczkolwiek niewielkie, sugeruje możliwość syntezy α -tokoferolu na drodze metylacji tego pierwszego. Większy wzrost α -tokoferolu aniżeli obserwowany spadek γ -tokoferolu świadczyć może również o innym bezpośrednim mechanizmie syntezy.

Co się tyczy siewek rosnących na świetle, obserwowany wzrost α -tokoferolu przy niewielkich wahaniach γ -tokoferolu pozwala przypuszczać o bezpośredniej syntezie α -tokoferolu z nieznanego bliżej prekursora. Intensywniejsza niż w ciemności synteza tego związku była spowodowana — być może — zaobserwowanym przez Fischera i Bohna powstawaniem fitolu na świetle, zachodzącym równocześnie z nagromadzeniem się chlorofilu.

Stwierdzony wzrost ogólnej sumy tokoferoli w początkowym okresie wegetacji zarówno u roślin etiolowanych, jak i eksponowanych na świetle odbywa się na skutek syntezy α -tokoferolu. Czy mechanizm powstawania α -tokoferolu na świetle jest podobny do syntezy tego związku w ciemności, jest sprawą otwartą. Zastanawiający jest wspomniany wyżej ubytek γ -tokoferolu w ciemności, nasuwający na myśl możliwość jego metylacji. Definitywne rozstrzygnięcie tego zagadnienia wymaga dalszych badań,

a zwłaszcza śledzenia zmian w ilościowym i jakościowym składzie tokoferoli w ciągu pełnego okresu wegetacji.

Z obserwacji zmian w składzie tokoferoli odnosi się wrażenie, że magazynowane w nasionach tokoferole o wysokich własnościach przeciwutleniających służą do zabezpieczenia nienasyconych tłuszczów roślinnych. Potwierdza to w pewnym stopniu zaobserwowana przez Piątkowskiego (1954) korelacja między zawartością tokoferoli a liczbą jodową olejów roślinnych. W rachubę wchodzi także możliwość zabezpieczenia procesów związanych z kiełkowaniem nasion. Do wyników Piątkowskiego należy jednak odnieść się z pewną rezerwą, gdyż dostępna mu metoda Furtera i Meyera oznaczania tokoferoli dotyczy ogólnej zawartości tych związków, a ponadto różni się względną specyficznością i czułością od metody przez nas stosowanej (Feldheim 1956, Wendt i Drokowa 1957).

Stwierdzona przez nas synteza karotenoidów w ciemności potwierdza liczne badania przeprowadzone na szeregu gatunków roślin w latach ubiegłych, głównie przez Straina (Goodwin 1952). Znaczna ilość ksantofilu w stosunku do karotenu też była wielokrotnie stwierdzana.

O wzmaganiu przez światło syntezy karotenoidów donoszono kilkakrotnie (cyt. Frank i Kenney 1955). Oświetlane rośliny, zgodnie z danymi literatury, syntetyzują w miarę upływu czasu głównie karoteny na niekorzyść ksantofilu.

Porównując karotenoidy z chlorofilem nie zaobserwowano, podobnie jak w doświadczeniach Norrisa (cyt. Goodwin 1952), aby synteza chlorofilu odbywała się kosztem karotenoidów. Stwierdzony przez S. Frank spadek stężenia karotenoidów w okresie powstawiania chlorofilu nie dał się w naszych badaniach uchwycić, gdyż przy stosowaniu 12-godzinnego oświetlenia karoteno- i chlorofilogeneza przewyższały znacznie destrukcję karotenoidów na świetle.

Nagromadzanie się karotenoidów i chlorofilu nie wpływa w początkowym okresie wzrostu na zmniejszenie zawartości tokoferoli w całej roślinie. Jeżeli rozpatrywać występowanie tych związków w przeliczeniu na suchą masę wzrost chlorofilu i karotenoidów w przeciwieństwie do wyników Zacharowej pokrywa się ze spadkiem tokoferoli.

WNIOSKI

1. Potwierdzono syntezę tokoferoli u siewek *Zea mays* L. rosnących zarówno w ciemności jak i na świetle.
2. Stwierdzono, że wzrost zawartości tokoferoli w obydwu przypadkach jest wynikiem syntezy α -tokoferolu.

3. Wysłunięto przypuszczenie, iż synteza α -tokoferolu odbywać się może na drodze bezpośredniej syntezy, a w ciemności częściowo na drodze metylacji γ -tokoferolu.

4. Nie stwierdzono konkurencyjnych stosunków w nagromadzaniu się tokoferoli, karotenoidów i chlorofilu w odniesieniu do 10 siewek, natomiast zaobserwowano przeciwny charakter syntezy tokoferoli w stosunku do karotenoidów i chlorofilu po przeliczeniu wyników na 1 g suchej masy.

Kierownikowi Katedry Fizjologii Roślin UMCS panu profesorowi dr Adamowi Paszewskiemu wyrażam serdeczne podziękowanie za umożliwienie mi wykonania niniejszej pracy i interesowanie się jej przebiegiem.

Katedra Fizjologii Roślin UMCS w Lublinie

Kierownik: Prof. Dr A. Paszewski

(Wpłynęło dn. 25.3.1959)

ADDENDUM: Już po napisaniu niniejszej pracy dotarła do naszych rąk publikacja Greena (J. Sci. Food and Agric. 1958, 9, 12, 801—12) dotycząca dystrybucji tokoferoli w cyklu życiowym roślin. Z czterech przebadanych roślin, u interesującej nas kukurydzy stwierdził on po raz pierwszy występowanie w nasionach pięciu tokoferoli ze znaczną przewagą γ -tokoferolu. Na liście tokoferoli, obok powszechnie stwierdzanych form α - i γ -, oraz wysuwanej przez nas możliwości występowania η -tokoferolu, autor ten podaje ponadto δ - i ξ -tokoferole. Wspomina również o nieznacznym śladach β - i ϵ -tokoferolu (ten ostatni podają również Mason i Jones 1958).

W doświadczeniach nad kiełkowaniem nasion kukurydzy na świetle i w ciemności Green stwierdził, podobnie jak to wykazaliśmy w naszych badaniach, wzrost zawartości α -tokoferolu i zmianę stosunku w składzie tokoferoli na korzyść α -tokoferolu.

W doświadczeniach polowych przez pierwsze trzy miesiące rozwoju rośliny obserwował on tworzenie się głównie α -tokoferolu, później syntetyzowany był również γ -tokoferol. Synteza innych tokoferoli związana była z powstawaniem nasion i ich dojrzewaniem.

Na podstawie przeprowadzonych badań Green wysuwa cztery możliwości syntezy tokoferoli (z wyjątkiem α -tokoferolu):

1. Tworzenie się tokoferoli w łodydze i liściach w niezależnej reakcji i jednocześnie przenoszenie ich do nasion.
2. Powstawanie tokoferoli w łodydze i liściach na drodze odmetylowania α -tokoferolu i przeniesienie wytworzonych produktów do nasion.
3. Bezpośrednie powstawanie tokoferoli w nasionach w miejscu odkładania lub pobliżu.
4. Powstawanie tokoferoli w nasionach, w miejscu ich odkładania na drodze odmetylowania α -tokoferolu.

W toku dyskusji opowiada się za ostatnim mechanizmem jako najbardziej prawdopodobnym.

Autor rozpatruje również możliwość syntezy α -tokoferolu jako procesu odwrotnego do przedstawionego w punkcie 4.

SUMMARY

Zaharova (1954) reported that in seedlings of peas and barley tocopherols were synthesized in darkness and supposed that also phytol must have been rapidly synthesized in these conditions. However, Fischer and Bohn (1958) found no phytol in etiolated seedlings of maize. In their opinion the synthesis of phytol takes place only in light when chlorophyll is present. Fischer and Bohn observed that in maize seedlings exposed to artificial light the level of phytol was higher than would have resulted from the chlorophyll content, and supposed that the „surplus“ of phytol might influence the more rapid synthesis of tocopherols.

The methods of Zaharova's experiments did not permit to identify which of the seven known tocopherols were formed in the seedlings. On the other hand, Brown (1952) demonstrated that some plants of the *Gramineae* family contained in their green organs only α -tocopherol. The presence in most seeds and vegetable oils of other tocopherols seems to indicate that a transformation in the composition of tocopherols may be possible during plant vegetation.

In view of these contradictory results it has been thought that investigations carried out with more accurate techniques might throw more light on the following problems:

1. the influence of darkness and light on the synthesis of tocopherols during the earliest stage of plant growth,
2. the possible changes in the composition and the level of tocopherols in the first days of growth,
3. the mutual relations between the particular kinds of tocopherols, carotenoids, and chlorophyll.

The experiments were carried out on *Zea mays* L. during the first seven days of growth in darkness and in light. Tocopherols were determined according to the method developed by Green et al. (1955). Determinations of chlorophyll were made with the chromatographic technique according to Więckowski (1957) and of carotenoids with Worker's (1957) method.

Tocopherols were synthesized by *Zea mays* L. seedlings growing in darkness as well as in light. In seedlings exposed to light the synthesis rate was higher. This result is conformable with the higher level of phytol observed by Fischer and Bohn in maize seedlings grown in similar conditions. The synthesis of tocopherols in darkness probably starts with some unknown precursor and does not necessitate the presence of phytol. The rise in the content of tocopherols in darkness as well as in light was due to the synthesis of α -tocopherol. It seems that α -tocopherol may be produced by way of direct synthesis and in darkness partly also by the methylation of γ -tocopherol. Competitive relations in the accumulation of

tocopherols, carotenoids, and chlorophyll were not observed relatively to 10 seedlings; on the other hand the synthesis of tocopherols had a competitive character with regard to carotenoids and chlorophyll when the results were calculated to one gram of dry mass.

Department of Plant Physiology

Marie Curie-Skłodowska University of Lublin,

Director Professor A. Paszewski.

LITERATURA

- Brown F., 1952a, The Estimation of Vitamin E. I. Separation of tocopherol mixtures occurring in natural products, *Biochem. J.* 51 (2); 237—239.
- Brown F., 1952b, The Estimation of Vitamin E. II. Quantitative analysis of tocopherol mixtures by paper chromatography, *Biochem. J.* 52 (3); 523—526.
- Eggitt Russell P. W., Ward L. D., 1953, The estimation of vitamin E activity by paper chromatography, *J. Sci. Food Agric* 4 (4); 176—179.
- Feldheim W., 1956, Beiträge zur chemischen Bestimmung von Tocopherol in Naturstoffen, Vitamine und Hormone 7 (2/3); 212—218.
- Fischer F. G., Bohn H., 1958, Über die Bildung und das Vorkommen von Phytol, *Liebigs Ann. Chem.* 611 (1—3); 224—235.
- Frank S., Kenney A. L., 1955, Chlorophyll and carotenoid destruction in the absence of light in seedlings of *Zea mays* L., *Plant Physiol.* 30 (5); 413—418.
- Goodvin T. W., 1952, *The Comparative Biochemistry of the Carotenoids*, London.
- Green J., Marcinkiewicz S., Watt P. R., 1955, The determination of tocopherols by paper chromatography, *J. Sci. Food Agric.*, 6 (5); 274—282.
- Mason E. L., Jones W. L., 1958, The tocopherol contents of some Australian cereales and flour milling products, *J. Sci. Food Agric.* 9 (8); 524—527.
- Piątkowski T., 1954, Próba charakterystyki niektórych odmian kukurydzy uprawianych w Polsce pod względem wartości tłuszczu uzyskanego z ich kielków, *Roczn. Nauk Roln.* 68-A-4; 635—645.
- Weisler L., Robeson C. D., Baxter J. G., 1947, Delta-Tocopherol. Assay of Individual Tocopherols in Mixtures Containing Delta-Tocopherol, *Analyt. Chem.* 19, 11.
- Wendt W. P., Drokowa I. G., 1958, O spieczystości niektórych kolorimetrycznych metod opredzielenia witamina E, *Witaminy* 3, Kijew AN USSR, 75—84.
- Więckowski S., 1957, Badania nad dziennymi zmianami w stężeniu chlorofilu w liściach roślin stanowisk nizinnych i górskich, *Acta Soc. Bot. Poloniae* 26 (4); 657—673.
- Worker N. A., 1957, A rapid procedure for the chromatographic separation and spectrophotometric estimation of certain pasture lipoids. I. Carotene, Xanthophyll and Chlorophyll, *J. Sci. Food Agric.* 8 (7); 442—444.
- Zacharowa M. P., 1954, K woprosu ob obrazowanii i lokalizacii witamina E w rastienii, *Trudy WNIWI*, V, 159—163.