Przemiany alkaloidów w łubinie białym po wprowadzeniu lupaniny i hydroksylupaniny

*Alkaloid changes in white lupine after introduction lupanine and
hydroxylupanine*

H. BIRECKA, H. RYBICKA, W. SZYMAŃSKA

Jak wykazały badania nad łubinem białym (Wiewiórkowski, Bratek 1957, Birecka, Rybicka, Ścibor-Marchocka 1959), w gatunku tym obok lupaniny, która występuje w największych ilościach i stanowi tzw. „główny alkaloid“, oraz obok hydroksylupaniny można stwierdzić obecność sparteiny, angustifoliny i trzech albo czterech zasad niezidentyfikowanych dotychczas chemicznie, a reagujących jak alkaloidy.

Według hipotez wysuwanych przez szereg badaczy (Hegnauer 1955, Worker 1956) opartych na doświadczeniach *in vitro*, bądź też na zmianach zachodzących w ilościach alkaloidów w ontogenezie roślin, sparteina ma być tym związkiem, z którego w łubinach powstaje lupanina, a z niej z kolei hydroksylupanina. W poprzednich naszych badaniach (Birecka, Sebyła, Nalborczyk 1959, Birecka, Szklarek, Mazan 1960) stwierdzono, że zarówno w łubinie białym pastewnym, jak i gorzkim, po wprowadzeniu sparteiny (w postaci soli siarczanowej) wzrasta zawartość nie tylko lupaniny i hydroksylupaniny, ale również innych alkaloidów charakterystycznych dla tego gatunku, a w większości niezidentyfikowanych chemicznie. W niniejszej pracy podajemy głównie wyniki uzyskane po wprowadzeniu do roślin lupaniny lub hydroksylupaniny.

METODYKA DOŚWIADCZEŃ

Przedmiotem badań był łubin biały, a) pastewny średniowczesny hodowli Barbackiego i b) gorzki odmiana „Czechowicka“.

Z roślinami tymi przeprowadzono 3 doświadczenia, hodując je uprzednio w wazonach wagnerowskich napełnionych mieszaniną gleby z piaskiem. Metodyka zakładania doświadczeń była analogiczna jak w bada-

niach poprzednich (Birecka, Sebyła, Nalborczyk 1959). W fazie rozwoju, odpowiadającej zakładaniu się pąków kwiatowych na pędzie głównym, rośliny pozbawiono korzeni odcinając łodygi powyżej liścieni i wprowadzono (przez łodygi) wodne roztwory odpowiednich alkaloidów oraz dla kontroli tylko wodę. Następnie rośliny łączono możliwie sterylnie węzem gumowym poprzez szklaną rurkę z kolbą, zawierającą pożywkę mineralną. Sposób wprowadzania alkaloidów, skład pożywki mineralnej, jej sterylizacja oraz sposób umieszczania łodyg był analogiczny jak w badaniach nad przemianami sparteiny (Birecka i in. 1960).

Doświadczenie I. Rośliny (tylko lubinu pastewnego) weszły 29.IV.1958 r. w hali wegetatywnej. Pozbawiono je korzeni 7.V i natychmiast zastosowano alkaloidy w postaci wolnych zasad: a) sparteiny w ilości 3,2 mg, b) lupaniny około 7 mg na roślinę. Roztwory te rośliny pobrały po upływie godziny, a następnie 2×2 ml H_2O również w ciągu około godziny. Doświadczenie trwało 7 dni (część roślin była zaciemniona): sprzętu dokonano natychmiast, tj. po 2 godz. i po 7 dniach. Po zdjęciu roślin pożywkę znajdującą się w rurkach gumowych badano na zawartość alkaloidów. Jedynie w wypadku sparteiny stwierdzono tylko bardzo słabe jej ślady w tych roztworach.

Doświadczenie II. Rośliny weszły 4.VIII.1958 r. w hali wegetacyjnej. Po pozbawieniu roślin korzeni w sposób analogiczny jak w doświadczeniu pierwszym dano im alkaloidy *, ale w postaci soli siarczanowej. Poszczególne rośliny populacji pastewnej otrzymały: lupaniny 6,1 mg, hydroksylupaniny — 5,2 mg. Roślinom populacji gorzkiej dawano lupaniny podwójną ilość, hydroksylupaniny — taką samą jak roślinom pastewnym. Szybkość pobierania tych związków była analogiczna jak w doświadczeniu 1. Rośliny zbierano natychmiast (po pobraniu roztworów i wody), po trzech i 10 dniach.

Doświadczenie III. Rośliny weszły 12.II.1959 r. (w ogrzewanej szklarni). 23.III.59 pozbawiono je korzeni i zastosowano alkaloidy w postaci soli siarczanowej. Rośliny populacji pastewnej otrzymały po 5,3 mg lupaniny i po 4,1 mg hydroksylupaniny. Roślinom populacji gorzkiej dawano podwójne ilości tych alkaloidów w tej samej objętości wody. Jednocześnie analogiczne ilości tych związków w objętości 0,3 ml wstrzykiwano do łodyg roślin populacji pastewnej (tylko hydroksylupaninę) i gorzkiej nie pozbawionej korzeni. Roślinom kontrolnym wstrzyknięto tylko wodę. W żadnym z doświadczeń nie obserwowano różnic w wyglądzie roślin — zarówno populacji pastewnej, jak i gorzkiej — w zależności od ilości czy też jakości stosowanego alkaloidu. U żadnej z roślin nie stwierdzono procesu regeneracji korzeni.

* dl lupanina, temp. top. $99^{\circ}C$; hydroksylupanina, temp. top. $176-177^{\circ}C$.

We wszystkich doświadczeniach w poszczególnych terminach sprzętu zbierano (około południa) po 4 rośliny z każdej kombinacji zabijając je natychmiast w suchym lodzie, a następnie biofilizując. Analizowano oddzielnie liście i łodygi, łącząc w jednej próbie dwie rośliny. Analizę na zawartość alkaloidów wykonano metodą ilościową stosując chromatografię bibułową dla rozdzielu (Birecka, Rybicka, Ścibor-Marchocka 1959) przy użyciu fazy rozwijającej: butanol: toluen: kwas solny (Reifer-Przeździecka, Kleczkowska 1959).

WYNIKI BADAŃ MATERIAŁU ROŚLINNEGO

Łubin pastewny. Lupanina w postaci zasady nie przemieściła się do liści ani w czasie jej wprowadzenia, ani też w ciągu następnych 7 dni (na świetle i w ciemności) — znaleziono ją jedynie w łodygach. Jak wykazały analizy, w ciągu tego okresu nie nastąpił wzrost zawartości innych alkaloidów w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Nie zmniejszyła się również zawartość lupaniny. Dlatego też wyników dotyczących tej części doświadczenia nie podajemy. Sparteina w postaci zasady w czasie jej wprowadzenia przemieściła się do liści w śladowych jedynie ilościach (tab. 1). Główna jej ilość pozostała w łodydze. Po upływie 7 dni istotną już zawartość sparteiny stwierdza się i w liściach, ale tylko u roślin, które znajdowały się na świetle. W kombinacji tej obserwuje się spadek ilości sparteiny w porównaniu z roślinami analizowanymi natychmiast po wprowadzeniu tego alkaloidu i jednocześnie istotny wzrost zawartości innych zasad w stosunku do roślin kontrolnych. Wzrost ten występuje jedynie w łodygach. W analogicznych roślinach ale zaciemnionych, obserwuje się również wzrost innych alkaloidów w łodygach, nieco jednak niższy niż u roślin na świetle. Należy przy tym podkreślić, że łubin pastewny zaciemniony (kontrolny), w odróżnieniu od roślin na świetle, w ciągu 7 dni doświadczenia nie zwiększył ani masy organicznej, ani też ilości alkaloidów. W obu następnych doświadczeniach z populacją pastewną (tab. 2) w ciągu badanego okresu czasu obserwuje się wyraźny wzrost roślin, szczególnie łodyg. Brak jest istotnych różnic między badanymi kombinacjami pod tym względem (z wyjątkiem ostatnich sprzętów serii z hydroksylupaniną). W przeanalizowanych chromatograficznie roślinach stwierdzono obecność sparteiny, lupaniny, hydroksylupaniny, angustifoliny, a_x , a_y i zasady, której R_f na trzech fazach rozwijających odpowiada R_f oksylupaniny. Ponieważ w obu doświadczeniach ilości sparteiny, angustifoliny i a_y były niewielkie i nie różniły się w zależności od badanych kombinacji w żadnym terminie sprzętu, danych liczbowych dotyczących tych alkaloidów nie podajemy. Jak wskazują analizy roślin kontrolnych (tab. 2) w ciągu 10 czy też 18 dni nastąpiło zwiększenie zawartości alkaloidów

Tabela 1

CieŜar roślin i zawartość w nich alkaloidów (μg w 1 roślinie). Łubin biały pastewny pozbawiony korzeni
(doświadczenie — kwiecień 1958 r.)

Czas sprzetu	Cześci rolin	Rośliny													
		kontrolne							po wprowadzeniu sparteiny						
		zawartość alkaloidów*							zawartość alkaloidów*						
		ciężar g.s.m.	suma- rycznie	spar- teina	lupa- nina	hydro- ksylu- panina	angu- stifo- lina	a _x	ciężar g.s.m.	suma- rycznie	spar- teina	lupa- nina	hydro- ksylu- panina	angu- stifo- lina	a _x
Na świetle															
po 2 godz	liście	1,00	89	31	51	ślady	—**	7	1,18	231	168	57	6	—**	ślady
	łodygi	0,92	280	69	157	25	—	29	1,22	2530	2330	170	7	—	23
	razem	1,92	369	100	208	25	—	36	2,40	2761	2498	227	13	—	23
po 7 dniach	liście	1,22	277		170	55***	11	41	1,51	814	567	199	25	—	23
	łodygi	1,86	405	69	279	42	56	28	2,20	1834	538	775	280	119	122
	razem	3,08	682	69	449	97	67	69	3,71	2648	1105	974	305	119	145
w ciemności															
po 7 dniach	liście	0,81	92	27	39	13	—	13	0,80	214	95	100	8	—	11
	łodygi	1,12	238	36	139	19	27	17	1,20	1895	950	673	97	124	51
	razem	1,93	330	63	178	32	27	30	2,00	2109	1045	773	105	124	62

* W analizach roślin nie uwzględniono a_y i alkaloidu o R_f oksylupaniny.

** Rośliny mogły zawierać pewne ilości tego alkaloidu, ale zbyt małe, aby móc je wykryć przy stosowanych rozcieńczeniach.

*** Jest to suma hydroksylupaniny i sparteiny, których nie udało się dobrze rozdzielić.

Tabela 2

Ciężar roślin i zawartość w nich alkaloidów* (μg w 1 roślinie). Łubin biały pastewny pozbawiony korzeni

Czas sprzętu	Części roślin	rośliny									
		kontrolne					po wprowadzeniu lupaniny				
		zawartość alkaloidów — μg			ciężar gs.m.		zawartość alkaloidów — μg			ciężar gs.m.	
		suma-ryczna	lupa-niny	hydro-ksylupa-niny?	a_x		suma-ryczna	lupa-niny	hydro-ksylupa-niny?	a_x	
Doświadczenie — wrzesień 1958 r.											
Po 2—3 godz	liście	0,84	104	49	17	27	11	0,94	981	912	34
	łodygi	0,49	125	74	17	29	5	0,59	1414	1340	27
	razem	1,33	229	123	34	56	16	1,53	2395	2252	61
Po 3 dniach	liście	1,04	74	28	20	19	7	1,03	946	900	17
	łodygi	0,71	167	90	19	29	29	0,72	1625	1482	45
	razem	1,75	241	118	39	48	36	1,75	2571	2382	62
Po 10 dniach	liście	±0,02		±5	±5	±6	±4	±0,16			±6
	łodygi	1,14	127	72	34	13	8	1,12	1661	1448	66
	razem	0,93	176	130	20	15	11	1,06	2021	1837	30
	liście	2,07	303	202	54	28	19	2,18	3682	3285	96
	łodygi	±0,07		±29	±7			±0,15		±150	±9
	razem										

Doświadczenie marzec — kwiecień 1959 r.

Po 2—3 godz	liście	0,50	109	55	24	30	—	0,48	671	604	27	40	—	0,54	275	19	240	16	—
	łodygi	0,48	106	50	30	26	—	0,42	2020	1919	50	34	17	0,49	1123	35	1036	52	—
	razem	0,98	215	105	54	56	—	0,90	2691	2523	77	74	17	1,03	1398	54	1276	68	—
Po 10 dniach	liście	0,75	76	39	13	20	4	0,69	1101	1030	27	40	4	0,69	561	83	346	132	—
	łodygi	0,93	227	90	54	27	56	0,90	2078	1790	132	96	60	0,90	1811	157	1230	299	125
	razem	1,68	303	129	67	47	60	1,59	3179	2820	159	136	64	1,59	2372	240	1576	431	125
Po 18 dniach	liście	±0,02		±12	±8	±2	±3	±0,19		±210	±28	±17	±7	±0,10		±72	±18	±102	±5
	łodygi	0,90	114	52	22	23	17	0,87	1244	1050	121	49	24	0,69	517	77	226	182	32
	razem	1,33	285	162	54	40	29	1,34	1932	1593	148	94	97	1,05	1569	130	1138	251	50
	liście	2,25	399	214	76	63	46	2,21	3176	2643	269	143	121	1,74	2086	207	1364	433	82
	łodygi	±0,10		±4	±6	±3	±7	±0,05		±10	±81	±3	±1	0,03		±4	±63	±48	±8
	razem																		

* Dla alkaloidów chemicznie niezidentyfikowanych przyjęto współczynnik ekstynkcji przy ilościowym oznaczeniu = 0,10 (odnosi się to do wszystkich tabel).

głównie wskutek wzrostu ilości lupaniny. Wzrost ten nastąpił przede wszystkim w łodygach omawianego łubinu. Rośliny, do których wprowadzono lupaninę (przemieściła się ona częściowo do liści) w postaci soli siarczanowej, już w ciągu pierwszych trzech dni wykazują pewien wzrost zawartości hydroksylupaniny i pozostałych alkaloidów. W 10 dniu w obu doświadczeniach obserwuje się znacznie większy przyrost ilości tych związków (przy pewnych różnicach szczególnie w przypadku a_x). Po 18 dniach (dośw. 2) zawartość hydroksylupaniny i a_x wzrasta. Warto zaznaczyć, iż większe w porównaniu z roślinami kontrolnymi ilości trzech (poza lupaninę) badanych alkaloidów występują najczęściej w łodygach. W organach tych więcej jest również lupaniny niż w liściach.

Rośliny, do których wprowadzono hydroksylupaninę (przemieściła się ona do liści w mniejszym stopniu niż lupanina), wykazują znaczne zwiększenie ilości — i to już nawet po trzech dniach — przede wszystkim alkaloidu o R_f oksylupaniny. Zawartość a_x wzrasta natomiast w mniejszym stopniu.

Największy wzrost zawartości tych zasad obserwuje się w łodygach. Wyniki oznaczeń lupaniny wskazują raczej na to, iż ilość tego alkaloidu

Tabela 3

Ciężar roślin i zawartość w nich alkaloidów (w μg w 1 roślinie)

Łubin biały pastewny nie pozbawiony korzeni

(Doświadczenie marzec — kwiecień 1959 r.)

Czas sprzętu	Części roślin	Rośliny							
		kontrolne				po wprowadz. hydroksylup.			
		Ciężar g.s.m.	zawartość alkaloidów			Ciężar g.s.m.	zawartość alkaloidów		
			lupa- nina	hydro- ksyłu- panina	(oksy- lupa- nina?)		lupa- nina	hydro- ksyłu- panina	(oksy- lupa- nina?)
Po 2—3 godzinach	liście	0,55	46	27	43	0,51	43	615	30
	łodygi	0,75	81	46	31	0,73	69	687	25
	razem	1,30	127	73	74	1,24	112	1402	55
Po 18 dniach	liście	1,08	51	34	40	1,09	114	582	591
	łodygi	1,38	87	71	64	1,35	52	198	573
	razem	2,46	138	105	104	2,44	166	780	1164

w omawianych roślinach nie uległa zwiększeniu w porównaniu z kontrolą (większa zawartość lupaniny w III terminie sprzętu dośw. 1958 obciążona jest dużym błędem, ponadto plon roślin w tej kombinacji jest znacznie większy niż kontrolnych).

Rośliny z korzeniami, do których wprowadzono hydroksylupaninę drogą iniekcji (tab. 3) nie wykazują również wzrostu ilości lupaniny, nato-

Tabela 4

Ciężar roślin pozbawionych korzeni i zawartość w nich alkaloidów (μg w 1 roślinie)
Łubin biały gorzki

Czas sprzętu	Części roślin	Rośliny																	
		kontrolne						po wprowadzeniu lupaniny						po wprowadzeniu hydroksylupaniny					
		ciężar g.s.m.	zawartość alkaloidów				ciężar g.s.m.	zawartość alkaloidów —				ciężar g.s.m.	zawartość alkaloidów—						
			sumaryczna	lupanina	hydroksy-lupanina	(oksylupa-nina?)		a _x	sumaryczna	lupanina	hydroksy-lupanina		(oksylupa-nina?)	a _x	sumaryczna	lupanina	hydroksy-lupanina	(oksylupa-nina?)	a _x
Doświadczenie — wrzesień 1958 r.																			
Po 2—3 godzinach	liście łodygi	0,60 0,33	2098 1988	1519 1205	104 132	219 358	256 293	0,57 0,32	5367 2935	4804 2400	106 88	330 214	127 233	0,66 0,38	3780 2772	2092 2994	1235 1236	175 367	278 175
	razem	0,93	4086	2724	236	577	549	0,89	8302	7204	194	544	360	1,04	6552	3086	2471	542	453
Po 10 dniach	liście łodygi	0,83 0,75	3552 5551	2107 3191	273 346	504 777	668 1237	0,96 0,72	7193 7896	5708 5436	253 809	614 738	618 913	0,92 0,80	5027 5466	2686 2737	1265 1623	538 448	538 658
	razem	1,62 ±0,07	9103	5298 ±330	619 ±78	1281 ±132	1905 ±124	1,68 ±0,11	15089	11144 ±76	1062 ±238	1352 ±57	1531 ±58	1,72 ±0,12	10493	5423 ±116	2888 ±250	986 ±60	1196 ±71
Doświadczenie — marzec — kwiecień 1959 tr.																			
Po 2—3 godzinach	liście łodygi	0,38 0,34	2928 1617	2171 1084	220 197	370 276	167 60	0,38 0,32	6161 2632	5219 2370	245 69	481 148	216 45	0,48 0,32	6149 4379	3281 1742	2086 2328	528 209	254 100
	razem	0,72	4545	3255 ±186	417	646	227	0,70	8793	7589	314	629	261	0,80	10528	5023 ±1155	4414 ±92	737	354
Po 10 dniach	liście łodygi	0,59 0,68	2543 2552	2173 1664	131 413	208 322	31 153	0,59 0,74	7362 6796	6024 4786	511 1057	279 408	548 545	0,63 0,75	5339 5410	1905 2117	2791 2446	393 547	250 300
	razem	1,27*	5095	3837	544	530	184	1,33 ±0,14	14158	10810	1568 ±152	687 ±72	1093 ±108	1,38 ±0,16	10749	4022 ±441	5237 ±15	940 ±104	550 ±69
Po 18 dniach	liście łodygi	0,65 0,98	2552 4466	1877 3350	203 306	170 417	302 393	0,66 0,97	6059 6697	4924 4345	367 1128	367 772	401 452	0,71 1,00	3844 7042	1382 2732	2072 3344	211 599	179 367
	razem	1,63 ±0,16	7018	5227 ±210	509 ±50	587 ±55	695 ±70	1,63 ±0,01	12756	9269 ±28	1495 ±7	1139 ±73	853 ±1	1,71 ±0,05	10886	4114 ±385	5416 ±238	810 ±20	546 ±15

* Ze względu na znacznie niższy plon jednego z dwóch powtórzeń podajemy plon i zawartość alkaloidów tylko z jednego powtórzenia.

miast bardzo zwiększyła się (i to w stopniu znacznie większym niż u roślin pozbawionych korzeni) zawartość alkaloidu o R_f oksylupaniny. Istotnych zmian w ilości a_x w tym doświadczeniu nie obserwowano.

Łubin gorzki. W obu doświadczeniach rośliny wykazują istotny wzrost, szczególnie łodyg (tab. 4). Jednakże przyrosty masy organicznej wczesną wiosną w szklarni były w analogicznym okresie czasu (10 dni) mniejsze niż w warunkach hali wegetacyjnej we wrześniu.

Należy jednak podkreślić, iż rośliny w hali w chwili zakładania doświadczenia miały znacznie większą masę liści. Obserwowane różnice w ciężarze roślin w zależności od badanych kombinacji są nieistotne.

Analizy wykazały obecność w łubinie gorzkim analogicznych chromatograficznie alkaloidów jak w populacji pastewnej. Ilości sparteiny w roślinach były minimalne; u roślin kontrolnych (zarówno pozbawionych, jak i nie pozbawionych korzeni) stanowiły 1—3% ogólnej zawartości alkaloidów. W innych kombinacjach stwierdzono analogiczne, bezwzględne ilości, nie ulegające istotnym zmianom w czasie trwania doświadczenia. Podobnie rzecz się miała z angustifoliną i a_y ; dlatego też zawartości tych alkaloidów nie podajemy.

W obu doświadczeniach stwierdza się istotny przyrost ilości alkaloidów w roślinach kontrolnych. Jednakże przyrost ten jest znacznie większy w analogicznym okresie w doświadczeniu pierwszym.

Wzrost zawartości alkaloidów we wszystkich przypadkach występuje głównie w łodygach.

Zastosowana lupanina w dużych stosunkowo ilościach przemieściła się do liści. W doświadczeniu pierwszym po 10 dniach nie obserwuje się zwiększenia innych alkaloidów z wyjątkiem może hydroksylupaniny (jednakże błąd oznaczenia w tym przypadku jest duży). W doświadczeniu drugim, w analogicznym okresie, w kombinacji tej występuje istotny wzrost hydroksylupaniny i a_x . W okresie późniejszym wzrasta również zawartość alkaloidu o R_f oksylupaniny.

Hydroksylupanina wprowadzona do roślin przemieściła się również w znacznych ilościach do liści. W serii tej w obu doświadczeniach nie stwierdza się — w granicy dokładności oznaczeń — wzrostu ilości lupaniny.

Nie stwierdza się również na ogół wzrostu innych alkaloidów z wyjątkiem dwóch przypadków, a mianowicie: alkaloidu o R_f oksylupaniny (dośw. II) w jednym również przypadku przyrost zawartości a_x jest udowodniony.

W roślinach nie pozbawionych korzeni (kombinacja kontrolna) w ciągu 18 dni istotnie zwiększyła się ilość alkaloidów, ale tylko lupaniny (tab. 5). Należy podkreślić, że sumaryczna zawartość tych związków (mimo

T a b e l a 5

Ciężar roślin i zawartość alkaloidów (w μg w 1 roślinie)
Łubin biały gorzki (rośliny nie pozbawione korzeni)

Doswiadczenie marzec — kwiecień 1959 r.

Rośliny													
Czas sprzętu	Części roślin	kontrolne					po wprowadzeniu lupaniny						
		Ciężar g.s.m.	zawartość alkaloidów —				ciężar g.s.m.	zawartość alkaloidów					
			suma- ryczna	lupa- nina	hydro- ksylu- panina	(oksy- lupa- nina?)		a _x	suma- ryczna	lupa- nina	hydro- ksylu- panina	(oksy- lupa- nina?)	a _x
Po 2—3 godzinach	liście	0,29	1707	1114	229	249	115	0,26	2770	2200	185	247	138
	łodygi	0,37	2074	1094	411	352	217	0,35	6914	5775	301	593	245
	razem	0,66	3781	2208	640	601	332	0,61	9684	7975	486	840	383
Po 10 dniach	liście							0,53	7152	6084	292	451	325
	łodygi							0,72	4538	3200	752	485	101
	razem							1,25	11690	9284	1044	936	426
Po 18 dniach	liście	0,74	3214	2284	267	323	340	0,80	10832	7800	496	1320	1216
	łodygi	0,74	1589	977	295	173	144	1,05	4326	2453	759	569	545
	razem	1,48	4803	3261	562	496	484	1,85	15158	10253	1255	1889	1761

uwzględnienia w analizach części podliścieniowej) jest nawet niższa niż w analogicznych roślinach pozbawionych korzeni. Odnosi się to szczególnie do łodyg (różnice ich w masie organicznej nie mogą usprawiedliwić obserwowanych różnic w zawartości alkaloidów). Wprawdzie w omawianym doświadczeniu nie analizowano korzeni — jednakże wyniki innych naszych badań wskazują, że organ ten w analogicznej fazie rozwoju zawiera bardzo małą ilość alkaloidów, wpływającą w nieznacznym tylko stopniu na ogólną zawartość tych związków w roślinie.

Wstrzyknięta do roślin lupanina w stosunkowo dużych ilościach przebiegała się do liści, ale głównie w czasie trwania doświadczenia. Podobnie jak u roślin bez korzeni, obserwuje się znaczny wzrost zawartości hydroksylupaniny, a_x i alkaloidu o R_f oksylupaniny, szczególnie po 18 dniach. Należy podkreślić, że największy przyrost ilości tych alkaloidów stwierdza się w liściach.

Wyniki uzyskane w serii roślin, do których wstrzyknięto hydroksylupaninę, były bardzo rozbieżne, dlatego też ich nie podajemy. Ta część doświadczenia wymaga powtórzenia.

We wszystkich wyżej omówionych doświadczeniach stwierdzone ilości wprowadzonego alkaloidu, nawet bezpośrednio po jego wprowadzeniu, były znacznie mniejsze niż ilości zastosowane. Znajdowano maksymalnie około 60—70% tych ilości.

W doświadczeniach 1959 roku zwrócono uwagę na czynniki mogące powodować te różnice. W próbce, z której rośliny pobierały alkaloid, pozostawało około 200—350 μg lupaniny (2—4%), hydroksylupaniny 70—85 μg (około 1—2%), w próbce po liofilizacji — 18—100 μg (w roślinach rozcieranych bezpośrednio po spręczeniu również obserwowano analogiczne straty jak i po liofilizacji). W pożywce znajdującej się w rurkach, w których tkwiły końce łodyg, nie było śladów alkaloidów. Po ponownej ekstrakcji chloroformem próbek roślinnych już raz ekstraktowanych znajdowano alkaloidów poniżej 1% ilości stwierdzonej w pierwszym ekstrakcie. Materiał roślinny był bardzo dobrze rozdrobniony, a więc i w tym nie można upatrywać ewentualnej niepełnej (w takim stopniu) ekstrakcji. Zgodność wyników zawartości alkaloidów w próbce badanej w różnych odstępach czasu była duża (w granicach dokładności stosowanej metody).

Wyżej omówione straty nie tłumaczą więc mniejszej ilości alkaloidów stwierdzonej przy ich chloroformowej ekstrakcji po uprzedniej alkaliczacji (10% NaOH) materiału roślinnego. Zjawiska tego nie można również tłumaczyć ewentualnym rozkładem mikrobiologicznym. Istnieje prawdopodobieństwo, że alkaloidy były w pewnym stopniu sorbowane na powierzchni części łodygi zanurzonej w roztworze w czasie wprowadzania do rośliny tych związków. Przy następnych manipulacjach z łodygą zachodziła możliwość usuwania ich z tej powierzchni.

Trudno przeprowadzić bilans alkaloidów w wypadku wstrzykiwania (nie badano korzeni, jak też nie ma pewności w omawianych wyżej doświadczeniach, że wstrzyknięty roztwór nie wyciekł następnie częściowo z łodyg). W innych naszych doświadczeniach z iniekcją sparteiny i lupaniny znajdowano w roślinach wprowadzone ilości alkaloidów.

DYSKUSJA

Przeprowadzone badania nad łubinem białym potwierdzają wyniki naszych poprzednich doświadczeń (Birecka, Szklarek, Mazar 1960) z populacją gorzką, a mianowicie, że rośliny pozbawione korzeni zdolne są do syntezy charakterystycznych dla nich alkaloidów. W omawianych doświadczeniach zawartość ich zwłaszcza lupaniny, była u tych roślin nawet wyższa niż u roślin nie pozbawionych korzeni. Wzrost zawartości alkaloidów po usunięciu korzeni obserwowano również w populacji pastewnej.

Należy podkreślić, że badany łubin korzystał z różnych źródeł azotu. W wyżej wspomnianych doświadczeniach stwierdzono, że rośliny pozbawione korzeni, znajdujące się na analogicznej pożywce mineralnej,abrały nawet więcej azotu aniżeli rośliny żyjące w symbozie z *Rhizobium*. Można więc przypuszczać, że i w omawianych badaniach stopień zaopatrzenia tych roślin w azot co najmniej nie był gorszy aniżeli łubinu, korzystającego z tego składnika wiązanego przez bakterie brodawkowe. Warto również dodać, że — podobnie jak w doświadczeniach poprzednich — wzrost zawartości alkaloidów w roślinach pozbawionych korzeni wystąpił głównie w łodygach, tzn. w organie, którego przyrost masy organicznej był największy.

Część doświadczenia związana ze sparteiną stanowi tylko niewielki fragment uzupełniający poprzednie badania (przytoczone we wstępie), w których stwierdzono możliwości przekształcania się tego alkaloidu w łubinie białym w lupaninę, hydroksylupaninę, angustifolinę, a_x , a_y i alkaloidu o R_f oksylupaniny. Dane uzyskane w omawianej części, w której sparteinę stosowano w postaci wolnej zasady, wskazują dodatkowo, że w populacji pastewnej u roślin pozbawionych korzeni podobne przemiany mogą zachodzić i w ciemności analogicznie do populacji gorzkiej oraz że mogą one przebiegać w łodygach.

Trudno jest wytłumaczyć, dlaczego lupanina w postaci wolnej zasady w ogóle nie przemieściła się do liści, a sparteina tylko w stopniu niewielkim.

Zasorbowana w nieznanym nam sposób w łodygach lupanina w ciągu badanego okresu czasu pozostała nie zmieniona. Inaczej zachowuje się ten

alkaloid w przypadku zastosowania jego w postaci soli. W obu doświadczeniach z populacją pastewną w tych warunkach stwierdzono istotny wzrost zawartości hydroksylupaniny, a_x i alkaloidu o R_f oksylupaniny. Należy przy tym podkreślić, że sumaryczny przyrost tych alkaloidów, stosunkowo niewielki w porównaniu z ilością wprowadzonej lupaniny i wykrytej w roślinie, jest mniejszy niż najczęściej stwierdzany przez nas przyrost ilości lupaniny po wprowadzeniu sparteiny, szczególnie jeśli uwzględni się czas trwania doświadczeń. Trzeba jednak brać pod uwagę fakt, że w badanych roślinach normalnie dominuje ilościowo lupanina, że stosunkowo niższe zawartości pozostałych alkaloidów mogą być wynikiem również i stosunkowo szybkich ich przemian, że ilości wprowadzonej lupaniny znacznie przekraczają ilości tego związku, jakie zazwyczaj obserwuje się w populacji pastwnej.

Nie mniej jednak w odróżnieniu od badań Nowackiego (1958), który podaje, iż po wprowadzeniu do łubinu białego lupaniny nie stwierdził zwiększenia zawartości nawet hydroksylupaniny (podobnie jak i wprowadzona przez niego hydroksylupanina nie ulegała przemianom na inne alkaloidy), należy podkreślić, że w podobnych warunkach może wystąpić przyrost ilości nie tylko tego alkaloidu, ale również i innych, charakterystycznych dla omawianego gatunku. Analogiczne badania, przeprowadzone z populacją gorzką, obciążone są znacznie większym błędem aniżeli w przypadku formy pastwnej. Jest to głównie wynikiem większej zmienności indywidualnej roślin i związanej z tym zmienności w zawartości alkaloidów. Mimo to uzyskane wyniki upoważniają do stwierdzenia, że w roślinach zarówno pozbawionych, jak i nie pozbawionych korzeni wprowadzona lupanina prawdopodobnie częściowo ulega również przemianom na inne alkaloidy, takie jak hydroksylupanina, a_x i związek o R_f oksylupaniny.

Jak już poprzednio wspomniano, doświadczenia nad ewentualnymi przemianami hydroksylupaniny w populacji gorzkiej nie dały dostatecznie pewnych wyników i wymagają powtórzenia. Wydaje się jednak, że alkaloid ten w badanych roślinach może ulegać częściowej przemianie na związek o R_f oksylupaniny.

W przypadku natomiast populacji pastwnej przyrost ilościowy tej zasady po wprowadzeniu hydroksylupaniny jest nawet znacznie większy niż przy zastosowaniu lupaniny (mimo iż różnice w zawartości alkaloidu wprowadzonego były na niekorzyść hydroksylupaniny). Wzrastała również, ale w stopniu znacznie mniejszym, ilość a_x . Można więc sądzić, w odróżnieniu od wyżej cytowanego autora, że i hydroksylupanina zdolna jest do przekształcenia się na niektóre inne alkaloidy w łubinie białym.

Na uwagę zasługuje fakt, że w żadnym z doświadczeń po wprowadzeniu

dzeniu do roślin lupaniny czy też hydroksylupaniny nie stwierdzono (w granicach błędu oznaczeń) przyrostu ilościowego sparteiny, a więc związku bardziej zredukowanego. Van der Kuy (1956) uważa, że w łubinie białym reakcja „sparteina $\rightarrow$ lupanina“ może być odwracalna i przypuszcza, że występuje ona głównie tak w czasie kiełkowania nasion, jak i w okresie tworzenia się strąków. Nasze badania odnoszą się do innej fazy rozwoju roślin, a mianowicie do okresu zakładania pąków kwiatowych na pędzie głównym, kiedy normalnie obserwuje się znaczny przyrost ilości alkaloidów w łubinie białym. W tej jednak fazie rozwoju, jak wskazują uzyskane wyniki, odwracalność reakcji „sparteina $\rightarrow$ lupanina“ jest bardzo mało prawdopodobna.

Przy rzutowaniu interpretacji wyników, otrzymanych w wyżej omówionych doświadczeniach na przemiany alkaloidów normalnie zachodzące w roślinach, należy mimo wszystko pamiętać o metodyce, przy której zastosowaniu wyniki te zostały uzyskane. Alkaloidy bowiem, których ewentualne przemiany były przedmiotem badań, nie powstały bezpośrednio w samej roślinie, wprowadzono je z zewnątrz, nie wiadomo również do jakich tkanek przemieściły się, tym bardziej w jakiej części komórki się znalazły. Niestety badania tego typu jak dotychczas zazwyczaj obciążone są analogicznymi niewiadomymi i zastrzeżeniami z nich wynikającymi.

STRESZCZENIE WYNIKÓW

1) Przeprowadzone doświadczenia nad łubinem białym wykazały, podobnie jak inne nasze badania, że w roślinach populacji gorzkiej pozbawionych korzeni może przebiegać synteza charakterystycznych dla nich alkaloidów. Tę samą zdolność wykazują rośliny populacji pastewnej.

2) W roślinach zarówno formy pastewnej, jak i gorzkiej nawet pozbawionych korzeni po wprowadzeniu lupaniny wzrasta zawartość hydroksylupaniny, a_x oraz alkaloidu o R_f oksylupaniny. Nie stwierdzono natomiast zwiększenia ilości sparteiny.

3) W roślinach populacji pastewnej po wprowadzeniu hydroksylupaniny zwiększa się zawartość alkaloidu o R_f oksylupaniny. Przyrost ten jest znacznie większy niż w przypadku zastosowania lupaniny. Wzrasta również, ale w stopniu znacznie mniejszym, zawartość a_x .

4) Zmiany w zawartości alkaloidów w populacji gorzkiej po wprowadzeniu hydroksylupaniny wskazują na możliwość przekształcania się jej w analogiczne zasady, jak w populacji pastewnej. Badania te jednak wymagają powtórzeń.

SUMMARY

Changes of alkaloid content in derooted and intact plants of white lupine (bitter and fodder forms) at the stage of flower-buds formation were investigated. At the same time the eventual transformation of lupanine or hydroxylupanine, introduced into these plants, was examined.

The results obtained showed, that:

1. Derooted plants of bitter form are able to synthesize alkaloids, normally occurring in them, in relatively great amounts (it confirms the results of our previous investigations). The same relies to plants of fodder lupine.

2. After lupanine introduction into plants even derooted — of fodder and bitter forms — an increase of the content of hydroxylupanine, a_x (compound yet unidentified chemically but reacting like an alkaloid), and of alkaloid, which according to its R_f seems to be oxylupanine, was noted. No increase of sparteine content was observed.

3. After introduction of hydroxylupanine into plants of fodder lupine, the content of the alkaloid, which chromatographically behaves like oxylupanine, increased. This increment is higher than in the case, when lupanine was introduced. Also a small increase of a_x content was observed.

4. The changes of alkaloids content in bitter lupine after introducing of hydroxylupanine indicate the possibility of its transformation into the same bases as in fodder form. However, this needs further confirmation.

LITERATURA

- Birecka H., Rybicka H., Ścibor-Marchocka A., 1959, Alkaloidy *Lupinus albus* i metoda ich oznaczania ilościowego, Acta Bioch. Pol. s. 6 (1).
- Birecka H., Sebyła T., Nalborczyk E., 1959, Przemiany sparteiny w łubinie białym, Acta Soc. Bot. Pol. 28 (2).
- Birecka H., Szklarek D., Mazan A., 1960, Przemiany alkaloidów w roślinach łubinu białego pozbawionych korzeni, Bul. Acad. Sci. Pol.
- Hegnauer M. R., 1955, Considerations botaniques et biogénétiques sur les alcaloides du genre *Lupinus*, Bul. Soc. Pharm. de Bordeaux 94 (Nr special 209).
- Van de Kuy A., 1956, Bijlage tot kennis van alkaloidvorming bij enkele species van het genus *Lupinus*, Gravenhage, dysertacja.
- Nowacki E., 1958, Badania nad syntezą alkaloidów w łubinie, Roczn. Nauk Roln. 79 (2).
- Reifer J., Przeździecka N., Kleczkowska D., 1959, Chromatograficzna metoda ilościowego oznaczania alkaloidów łubinowych, Acta Bioch. Pol. 6 (1).
- Wiewiórowski W., Bratek M. D., 1957, Die qualitative Alkaloidzusammensetzung der Lupine im Lichte chromatographischer Untersuchungen, Acta Soc. Bot. Pol. 26 (1).
- Woker G., 1956, Die Chemie der natürlichen Alkaloide, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.