Badania nad alkaloidami łąbinu białego (*Lupinus albus*) w czasie jego wegetacji

Część III. Łubin biały gorzki — w najwcześniejszych i późniejszych fazach rozwoju ontogenetycznego

*Changes of alkaloid content in plants of Lupinus albus during their
vegetation. Part III. White bitter lupin — in the earliest and the late
ontogenetic stages*

H. BIRECKA, U. WOJCIESKA

W poprzednio opublikowanych badaniach nad alkaloidami gorzkiego łąbinu białego — w kulturach wazonowych — (H. Birecka, W. Szymańska, A. Ścibor-Marchocka 1960) stwierdziliśmy maksymalną zawartość tych związków (która do końca wegetacji nie ulegała zmianie) już w 70-tym dniu wzrostu roślin, po przekwitnięciu pędów bocznych. Największy przyrost ilości alkaloidów w tym doświadczeniu wystąpił w okresie kształtowania się strąków na pędzie głównym — między 56 a 70 dniem wegetacji. Charakter wzrostu i rozwoju łąbinu w wazonach różni się dość istotnie od charakteru obserwowanego w warunkach polowych. W tych warunkach wzrost pędów bocznych jest znacznie intensywniejszy, ponadto wytwarzają one dość dużo w pełni wykształconych strąków; natomiast w kulturach wazonowych można stwierdzić na tych pędach jedynie pojedyncze strąki i to u nielicznych tylko roślin. Dlatego też, w celu sprawdzenia uzyskanych uprzednio wyników, przeprowadzono podobne doświadczenie w warunkach polowych. W doświadczeniu tym główną uwagę zwrócono na fazy rozwojowe następujące po kwitnieniu. Ponadto w niżej omówionych badaniach prześledzono zmiany w ilości i składzie alkaloidów w pierwszym okresie rozwoju ontogenetycznego roślin (tj. od chwili zawiązania się nasion do ich dojrzenia), następnie w czasie spoczynku oraz kiełkowania. We wszystkich doświadczeniach — podobnie jak i w wyżej wspomnianych — wysiewano nasiona gorzkiej populacji łąbinu białego odmiany Czechnickiej.

METODYKA BADAŃ

Doświadczenie I. Założono na poletkach Katedry Fizjologii Roślin na terenie SGGW. Nasiona (podobnie jak i w następnych doświadczeniach sprawdzone pod lampą UV — Latawiec, 1958) wysiano 30 kwietnia 1958 r. w rozstawie 25×10 cm. Wschody nastąpiły 10—12 maja. Początek kwitnienia pędu głównego zaobserwowano 16 VI, pełne zaś kwitnienie 23 VI. Zbiory roślin przeprowadzono w 6 terminach poczynając od 1 lipca — po 3 powtórzenia. W pierwszych dwóch terminach ścinano po 15 roślin, a w następnych po 10 roślin w powtórzeniu.

Tabela 1 — Table 1

Terminy zbiorów
Dates of harvests

Data zbioru Date of harvest	Wiek roślin w dniach Age of plants in days	Stan roślin State of plants
1.VII	50	Rośliny na pędzie głównym zawiązały strąki; kwitnienie pędów bocznych I rzędu. Pods formed on the main shoot; flowering on Ist. order lateral shoots.
9.VII	58	Strąki pędów głównych są długości około 3 cm; kwitnienie pędów bocznych II rzędu. Pods on mains shoot ca 3 cm. long; flowering on IInd order lateral shoots.
17.VII	64	Strąki pędów głównych wypełniają się. Starzenie się liści dolnych na pędzie głównym i częściowe ich opadanie Pods on mains shoot are filled. Basal leaves on main shoot are aging and partly fall down.
30.VII	77	W strąkach pędów głównych zanika chlorofil; intensywny wzrost strąków na pędach bocznych I rzędu. Powstałe na pojedynczych roślinach strąki pędów bocznych II rzędu pozostają nie wypełnione. In pods on main shoot chlorophyll disappears; intensive growth of pods on Ist order lateral shoots. The pods on the IInd order lateral shoots of single plants are still unfilled.
19.VIII	97	Strąki pędów głównych zaczynają brunatnieć, całkowity brak liści na tych pędach. Opadanie liści na pędach bocznych. Main shoots without leaves and with pods already beginning to turn brown. The leaves of lateral shoots fall down.
16.IX	125	Rośliny w pełni dojrzałe Plants fully mature.

Zebrane rośliny podzielono na następujące części: 1. liście, 2. łodygi, 3. kwiaty, 4. łupiny, 5. nasiona, badając oddzielnie pędy główne i pędy boczne (I i II rzędu razem). Organy wegetatywne zabijano w temp. 105°C w ciągu 15 minut i następnie suszono w temp. 60°C . Organy generatywne po zamrożeniu liofilizowano. Zmielony materiał roślinny analizowano na zawartość alkaloidów, podobnie jak w wspomnianych we wstępie badaniach, z tą jednak różnicą, że w częściach wegetatywnych oznaczano tylko sumę alkaloidów przyjmując współczynnik ekstynkcji = 0,105.

Dojrzałe nasiona zebrane oddzielnie z pędów głównych i bocznych (przeanalizowane po upływie 10 dni od zbioru) posłużyły jako materiał do dalszych badań. Przechowywano je w pomieszczeniu nie opalanym, w słojach szklanych przykrytych watą.

Doświadczenie II. Celem jego było przebadanie ewentualnych zmian w zawartości alkaloidów w nasionach w stanie spoczynku. Trzy próbki po 50 nasion pobierano 17-ego każdego miesiąca, poczynając od listopada, tj. 2 miesiące po zbiorze roślin.

Analizy nasion pędu głównego, jak i pędów bocznych prowadzono przez 6 miesięcy oznaczając każdorazowo również zawartość w nich wody (zawartość ta nie ulegała zmianie w czasie przechowywania).

Doświadczenie III. W celu zbadania zmian ilości alkaloidów w czasie kiełkowania nasion 16 maja 1959 r. założono następujące doświadczenie: nasiona (pędu głównego) potraktowano 0,2% sublimatem, a następnie przemyto dokładnie sterylną wodą destylowaną. Kiełkowanie przebiegało na szalkach Petriego (w ciemności) wyłożonych bibułą filtracyjną (wysterylizowaną uprzednio podobnie jak i szalki) w termostacie (naświetlonym uprzednio lampą kwarcową). Wodę do nasion doprowadzano przez podsiąkanie zanurzając odpowiednie skrawki bibuły w zlewkach z wodą. Przewidziano 4 terminy sprzętu w trzech powtórzeniach (w I terminie po 100, a w pozostałych po 50 nasion). Kiełkowanie w 100% było bardzo równomierne. Pierwszy zbiór przeprowadzono 19 maja — (kiełki o długości 1 do 1,3 cm), następne zaś trzy zbiory w odstępach trzydniowych, a więc 22, 25 i 28 maja. Po drugim sprzęcie — 22.V. — rośliny umieszczono w kiuwetach na sztywno rozpiętej gazie i trzymano je na wodzie wodociągowej w hali wegetacyjnej. Natychmiast po zbiorze materiał zamrażano, a następnie liofilizowano. Analizowano oddzielnie liścienie, liście, hypokotyl i korzenie. W celu sprawdzenia ewentualnego wydzielania się alkaloidów w czasie kiełkowania na zewnątrz, bibułę, na której znajdowały się nasiona, alkalizowano 1 n NaOH, ekstrahowano chloroformem i po oczyszczeniu oznaczano w ekstrakcie zawartość alkaloidów. Doświadczenie to w analogicznych warunkach powtórzono jeszcze dwukrotnie (nie oddzielając już przed analizą poszczególnych części roślin): 1.VIII.1960 r. (użyto

takich samych nasion jak w doświadczeniu poprzednim) — rośliny sprzątano po 2, 4 i 6 dniach od chwili umieszczenia na szalkach *, oraz 13.V. 61 r. — nasiona (100% kiełkowania) tej samej odmiany, pochodziły jednak ze zbiorów 1960 r. Rośliny sprzątano po 4. (długość korzonków 2—3 cm) i 8 dniach (długość korzeni 4—6 cm, liścienie zielone). W ostatnich dwóch doświadczeniach rośliny zabijano w 105°C, następnie suszono w 60°.

WYNIKI

Doświadczenie I

Niemожność zbierania opadających liści z poszczególnych roślin w warunkach polowych powoduje, iż dane dotyczące ich ciężaru szczególnie w późniejszych okresach wegetacji (tab. 2) nie są w pełni wiarygodne. Niemniej można stwierdzić, iż liście pędu głównego od 50-go dnia wzrostu już nie zwiększały swego ciężaru, a raczej zmniejszały. Maksymalny przyrost liści pędów bocznych przypada na okres między 50 a 58 dniem wegetacji. W tym też czasie występuje znaczny wzrost łodyg tych pędów, jak również — chociaż słabszy — wzrost łodyg pędu głównego. Największy przyrost plonu roślin, przejawiający się głównie w zwiększeniu masy strąków, przypada na okres między 64 a 77 dniem. Prawie całkowite wypełnienie się nasion (zarówno na pędach głównych, jak i bocznych) można stwierdzić już w 97 dniu wegetacji.

Procentowa zawartość alkaloidów w liściach i łodygach pędów bocznych jest znacznie wyższa niż w analogicznych organach pędu głównego — we wszystkich terminach zbioru (tab. 3). Spadek względnej ilości tych związków w pędzie głównym stwierdza się już od 64, w pędach zaś bocznych — od 77 dnia wzrostu. Zacznie mniejsze różnice — o ile w ogóle występują — między badanymi pędami obserwuje się w %-owej zawartości alkaloidów w łupinach oraz nasionach.

Ogólna ilość tych związków w 50-tym dniu wzrostu stanowi niespełnia 30% maksymalnej zawartości stwierdzonej w roślinach w 77-tym dniu wegetacji (mniejsza ich ilość w późniejszych zbiorach jest głównie wynikiem strat liści na skutek opadania). W okresie między 50 a 58 dniem zawartość alkaloidów znacznie wzrasta. Prawie cały ten przyrost przypada na liście i łodygi pędów bocznych. Największy jednak wzrost zawartości alkaloidów występuje między 64 a 77 dniem wegetacji. Składa się na niego zwiększenie się sumy tych związków w strąkach

* Po 30 nasion w powtórzeniu.

Tabela 2—Table 2

Ciężar 1 rośliny — g s.m.

Weight of white bitter lupin — g d.m. per plant

Wiek roślin w dniach Age of plants days	Części wegetatywne — Vegetative parts					Części generatywne — Generative parts							Części nadziemne Aerial parts total
	pęd główny main shoot		pędy boczne lateral shoots		razem total	pęd główny main shoot			pędy boczne lateral shoots		razem total		
						liście leaves	łodyga stem	liście leaves	łodygi stems	kwiaty flowers		łupiny hulls	
50	5,38	6,62	4,78*	2,94	19,72	0,09	0,16	0,02	—	—	0,27	19,99	
58	4,27	8,50	8,93	7,49	29,19		0,84	0,13	0,23	0,12**	1,32	30,51	
64	2,62	8,03	7,78	7,21	25,64		3,25	0,74		1,11	5,26	30,90	
77	1,00	9,57	8,08	8,22	26,87		7,34	4,00		6,74	20,35	47,22	
97	—	8,46	2,50	7,39	18,35		4,09	7,77		6,21	26,06	44,41	
125	—	7,77	—	7,28	15,05		2,74	8,56		3,82	23,53	38,58	
μt (P = 0,05) 0,46													

 μt (P = 0,05)

64												0,27	0,05
77							0,66	0,18				0,46	0,54
97							0,51	0,46				0,18	1,57
125							1,07	0,64				0,85	0,69
							0,21	0,35					

* Wraz z kwiatami pędów bocznych
Together with flowers from lateral shoots.** Wraz z zawiązanymi nasionami.
Together with the formed seeds.

Tabela 3 — Table 3

Zawartość alkaloidów
Alkaloid content

Wiek roślin w dniach Age of plants days	Części wegetatywne — Vegetative parts					Części generatywne — Generative parts					Części nadziem- ne aerial parts total		
	pęd główny main shoot		pędy boczne lateral shoots		razem total	pęd główny main shoot		pędy boczne lateral shoots		razem total			
	liście leaves	łodygi stem	liście leaves	łodygi stems		kwiaty flowers	łupiny hulls	nasiona seeds	kwiaty flowers			łupiny hulls	nasiona seeds

zawartość alkaloidów — % s.m. — alkaloid content — % d.m.

50	0,53	0,38	1,19	0,97		2,02	2,31	0,93	—	—	
58	0,58	0,40	1,41	1,00			1,75	1,31	—	—	
64	0,48	0,33	1,47	0,92			1,35	1,35	1,92	—	
77	0,45	0,29	1,18	0,87			1,49	2,03	1,64	1,44	
97	—	0,16	0,57	0,67			0,93	1,81	1,41	1,93	
125	—	0,10	—	0,17			0,79	2,26	0,93	1,61	
									0,64	2,34	

zawartość alkaloidów — mg w 1 roślinie — alkaloid content — mg per plant

50	28,5	25,2	56,9	28,5	139,1	1,8	3,7	0,2	—	—	5,7	144,8
58	24,8	34,0	125,9	74,9	259,6		14,7	1,7	2,3	—	23,4	283,0
64	12,6	26,5	114,4	66,3	219,8		43,9	10,1	18,2	2,3	74,5	294,3
77	4,5	27,7	95,3	71,5	199,0		109,2	81,3	95,0	43,8	329,3	528,3
97	—	13,5	14,3	49,5	77,3		38,2	140,6	57,8	128,7	365,3	442,6
125	—	7,8	—	12,4	20,2		21,6	193,5	24,5	196,8	436,4	456,6

przy jednoczesnym niewielkim ich zmniejszeniu w organach vegetatywnych. Zawartość alkaloidów w strąkach pędu głównego w 77 dniu wzrostu osiąga właściwie prawie maksymalną swą wartość. W okresie następnym obserwuje się już głównie przemieszczenie tych związków z łupin do nasion. Natomiast w strąkach pędów bocznych w tym czasie ilość alkaloidów jeszcze znacznie wzrasta, ulegając również przemieszczaniu do nasion.

Należy zaznaczyć, że począwszy od 77 dnia vegetacji zawartość badanych związków w organach vegetatywnych ulegała bardzo silnemu zmniejszeniu.

Tabela 4 przedstawia wyniki analiz zawartości poszczególnych alkaloidów w łupinach oraz nasionach. Należy podkreślić, że zasady te zostały rozdzielone tylko przy pomocy chromatografii bibułowej, a więc metodą, która nie daje pełnego rozdziału alkaloidów łubinu białego. W jednej z poprzednich prac (Birecka, Nalborczyk 1961) stwierdziliśmy, iż w badanym gatunku występuje co najmniej jeszcze jeden alkaloid zachowujący się chromatograficznie (w stosowanych przez nas fazach rozwijających) jak hydroksylupanina. Wg M. Wiórowskiego i I. Reifera (1961) frakcja o R_f podobnym do R_f oksylupaniny składa się nie z jednego, ale z trzech związków*. Dlatego też większość wyszczególnionych przez nas alkaloidów należy raczej traktować jako określone frakcje, w których nazwana zasada dominuje ilościowo. Trzeba również dodać, że w badanych łupinach i nasionach stwierdzano chromatograficznie obecność angustifoliny, jednakże w minimalnych ilościach (oznaczano ją łącznie z lupaniną).

Spśród uzyskanych wyników następujące zasługują na uwagę:

1. Stopień zwiększania się ilości lupaniny w strąkach jako całości w miarę ich kształtowania się jest podobny do stopnia zwiększania się ogólnej zawartości alkaloidów. Udział jej więc w sumie tych związków we wszystkich badanych okresach jest stały (w granicach 70 do 75%). Jednakże poczynając od okresu intensywnego napełniania się nasion (na pędzie głównym po 64, na pędach bocznych — po 77-ym dniu vegetacji) udział lupaniny w ogólnej zawartości alkaloidów w łupinach znacznie maleje (do 45—47%), nie ulegając większym zmianom w nasionach.

2. Ilość alkaloidów frakcji o R_f zbliżonym do R_f oksylupaniny wzrasta bardzo silnie (ponad sześciokrotnie) w okresie między 64 i 77 dniem — głównie w łupinach i nasionach strąków pędu głównego, w ciągu zaś następnych 20 dni ulega znacznemu obniżeniu. W końcu vegetacji udział tej frakcji w łupinach wynosi 16—20%, w nasionach zaś 5—7%.

* Autorzy niestety nie podają, czy frakcja ta została wyizolowana z łubinu białego czy też z wąskolistnego.

Wiek roślin w dniach Age of plants days	Strąki pods	mg					Procentowy udział in % total amount				
		lupa- nine	hy- dro- ksyłu- pani- ne	multi- flori- ne	alkal. of R _t of oxy- lupa- ni- ne**	a _y **	lupa- nine	hy- dro- ksyłu- pani- ne	multi- flori- ne	alkal. of R _t of oxy- lupa- nine	a _y
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
58	łupiny pędów głównych hulls of main shoots	10,3	0,8	1,7	1,4	0,5	70	5	12	10	3
	nasiona pędów głównych seeds of main shoots	1,2	0,04	ślady	0,4	0,1	70	2	—	23	5
	strąki pędów bocznych pods of lateral shoots	1,7	0,1	0,2	0,3	0,1	71	5	8	12	5
	razem total	13,2	0,9	1,9	2,1	0,7	70	5	10	11	4
64	łupiny pędów głównych hulls of main shoots	33,0	2,2	2,9	3,6	2,2	75	5	7	8	5
	nasiona pędów głównych seeds of main shoots	7,2	0,7	0,6	1,4	0,2	71	7	6	14	2
	łupiny pędów bocznych hulls of lateral shoots	14,0	0,7	0,3	2,7	0,5	77	4	2	14	3
	nasiona pędów bocznych seeds of lateral shoots	2,0	0,1	—	0,1	0,1	87	4	—	5	4
	razem total	56,2	3,7	3,8	7,8	3,0	75	5	5	10	4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
77	łupiny pędów głównych hulls of main shoots	68,6	10,2	5,9	22,8	1,7	63	9	5	21	2
	nasiona pędów głównych seeds of main shoots	55,0	3,7	2,2	18,4	2,0	68	5	3	22	2
	łupiny pędów bocznych hulls of lateral shoots	79,7	5,8	3,0	5,2	1,3	84	6	3	6	1
	nasiona pędów bocznych seeds of lateral shoots	33,3	3,6	3,0	3,0	0,9	76	8	7	7	2
	razem total	236,6	23,3	14,1	49,4	5,9	72	7	4	15	2
97	łupiny pędów głównych hulls of main shoots	17,0	8,2	4,6	7,4	1,0	45	21	12	19	3
	nasiona pędów głównych seeds of main shoots	108,6	9,5	5,1	13,1	4,1	77	7	4	9	3
	łupiny pędów bocznych hulls of lateral shoots	38,8	12,8	2,6	2,2	1,4	67	22	5	4	2
	nasiona pędów bocznych seeds of lateral shoots	102,4	8,9	7,2	9,6	0,6	80	7	5	7	1
	razem total	266,8	39,4	19,5	32,3	7,1	73	11	5	9	2
125	łupiny pędów głównych hulls of main shoots	10,0	5,0	2,6	3,5	0,5	47	23	12	16	2
	nasiona pędów głównych seeds of main shoots	141,2	22,9	10,9	10,6	7,9	73	12	6	5	4

c.d. tab. 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	łupiny pędów bocznych hulls of lateral shoots	11,2	5,1	2,0	4,9	1,3	46	21	8	20	5
	nasiona pędów bocznych seeds of lateral shoots	142,4	24,0	10,9	12,7	6,8	72	12	6	7	3
	razem total	304,8	57,0	26,4	31,7	16,5	70	13	6	7	4

* Stosunki ilościowe między alkaloidami w strąkach pierwszego zbioru nie różniły się istotnie od stosunków stwierdzonych w zbiorze drugim.

The alkaloids content in pods from Ist harvest were alike to those from IInd harvest.

** Przy oznaczeniu kolorymetrycznym przyjęto współczynnik ekstynkcji — 0,10.

In colorimetric determinations the accepted extinction coefficient was 0.10.

3. Ilość frakcji hydroksylupaniny wzrasta stopniowo w okresie od 64 aż do 125 dnia i jednocześnie jej udział w sumie alkaloidów zwiększa się z 5 do 13%. Należy zaznaczyć, iż w ostatnim miesiącu wegetacji frakcja ta w łupinach stanowi 21—23% ogólnej zawartości badanych zasad.

Doświadczenie II

Ciężar nasion pędów głównych i bocznych w okresie spoczynku (tab. 5) nie wykazuje istotnych zmian. Należy zaznaczyć, że przy pobieraniu próbek usuwano nasiona niecałkowicie wypełnione, które występowały w strąkach pędów bocznych. Jest to najprawdopodobniej przyczyną: 1) większej zmienności ciężaru nasion tej serii analizowanych w różnych terminach, 2) nieco niższej w nich procentowej zawartości alkaloidów w porównaniu z wynikami uzyskanymi bezpośrednio po spręczeniu.

W czasie spoczynku sumaryczna ilość badanych zasad nie ulegała zmianom (wszystkie różnice znajdują się w granicach błędu doświadczenia). Skład jakościowy oznaczanych chromatograficznie alkaloidów w żadnym terminie analizy nie różnił się od składu stwierdzonego w nasionach bezpośrednio po zbiorze. Jednakże w końcowym okresie przechowywania (poczynając od lutego) można stwierdzić pewne zmiany w stosunkach między poszczególnymi frakcjami (tab. 6). I tak w tym czasie procentowy udział lupaniny zarówno w nasionach pędu głównego, jak i bocznego ulega zmniejszeniu. Jednocześnie w pewnej mierze wzrasta udział frakcji alkaloidów o R_f zbliżonym do R_f oksylupaniny, a także i hydroksylupaniny.

Tabela 5 — Table 5

Sumaryczna zawartość alkaloidów w nasionach w stanie spoczynku

Total amount of alkaloids in dormant seeds

Data analizy Date of analysis	Nasiona — Seeds					
	pędów głównych of main shoots			pędów bocznych of lateral shoots		
	ciężar 50 nasion weight of 50 seeds g d.m.	zawartość alkaloidów alkaloid content		ciężar 50 nasion weight of 50 seeds g d.m.	zawartość alkaloidów alkaloid content	
		%	mg		%	mg
17.XI	23,1	2,19	507	23,1	2,12	489
17.XII	22,8	2,00	455	22,4	2,18	488
17.I	23,9	2,09	500	24,1	2,08	502
17.II	23,6	2,17	514	24,0	2,08	500
17.III	23,1	2,25	518	24,4	2,23	521
17.IV*	23,1	2,21	510	21,3	2,23	475
16.V	22,6	2,18	493			

* W tym terminie oznaczono tylko sumy alkaloidów (przyjęto współczynnik ekstynkcji — 0,105).

At this date only total alkaloids were determined (the accepted extinction coefficient — 0.105).

Tabela 6 — Table 6

Procentowy podział poszczególnych frakcji alkaloidów w nasionach znajdujących się w stanie spoczynku

Content (%) of particular alkaloid fractions in the total alkaloids amount in dormant seeds

Data analizy Date of analysis	Nasiona — Seeds									
	pędów głównych of main shoots					pędów bocznych of lateral shoots				
	lupa- nine	hydro- xylu- pa- nine	multi- flori- ne	alka- loids of R _f of oxylu- panine	a _y	lupa- nine	hydro- xylu- pa- nine	multi- flori- ne	alka- loids of R _f of oxylu- panine	a _y
17.XI	75	11	6	6	2	72	13	5	5	5
17.XII	74	10	8	4	4	69	10	10	5	6
17.I	68	12	8	6	6	72	10	8	6	4
17.II	61	13	13	11	2	63	14	7	9	7
17.III	62	15	7	12	4	62	12	7	14	5
16.V	51	15	14	8	12					

Doświadczenie III

Ciężary poszczególnych próbek po 50 nasion użytych w doświadczeniu wahały się w granicach 21,7—22,6 g. Ciężar roślin (bez okryw nasiennych) w ciągu 12 dni wzrostu przedstawia tabela 7. Stopniowy spadek masy organicznej można stwierdzić do 9 dnia od początku pęcznienia (intensywną syntezę chlorofilu obserwowano między 6 i 9 dniem).

Tabela 7 — Table 7

Ciężar 50 roślin — g s.m.

Weight of 50 plants — g d.m.

(doświadczenie założone 16.V.1959)

Termin sprzętu Date of harvesting	Liścienie cotyledons	Liście leaves	Hypokotyl hypocotyl	Korzenie roots	Razem total
Nasiona przed pęcznieniem Seeds before imbibition					19,45*
Po 3 dniach after 3 days	17,51**			1,29***	18,80
„ 6 „	15,27	0,08		1,61***	16,96
„ 9 „	13,89	0,68	0,96	1,03	16,56
„ 12 „	12,09	2,45	1,55	1,90	17,99
μt ($p = 0,05$)					0,365

* Ciężar podany bez okryw nasiennych, których masa przeciętnie wynosiła 3,15 g.
Weight without seed coats, the average mass of which was 3,15 g.

** Wraz z ciężarem listków.
Together with leaflets.

*** Wraz z ciężarem hypokotyli.
Together with hypocotyl.

W okresie zaś następnych trzech dni rośliny wykazują już dość istotny przyrost ciężaru. W ciągu całego czasu trwania doświadczenia masa liścieni stopniowo obniża się, przy jednoczesnym wzroście liści, hypokotyli i korzeni.

Analiza bibuły, na której znajdowały się nasiona (tab. 8), wykazała obecność niewielkich ilości alkaloidów, które w stosunku do ogólnej ich zawartości w 50 nasionach stanowią wartość niższą niż 1%. Sumaryczna ilość badanych zasad w roślinach zmniejsza się znacznie (ponad 25%) po trzech dniach od chwili rozpoczęcia procesu pęcznienia nasion. W okresie późniejszym nie ulega ona już istotnym zmianom.

W tym czasie następuje stopniowe zmniejszenie się zawartości alkaloidów w liścieniach, czemu towarzyszy — również stopniowe jej zwiększanie w rosnących organach.

Należy zaznaczyć, iż procentowa zawartość badanych zasad w tych organach jest stosunkowo bardzo wysoka, znacznie wyższa niż w liście-

Tabela 8 — Table 8

Zawartość alkaloidów w 50 roślinach

Alkaloid content in 50 plants

(doświadczenie założone 16.V.1959)

Termin sprzętu Date of harvesting	Zawartość alakloidów — Alkaloids content									Alkaloidy stwierdzone w bibule Alkaloids in filter paper mg
	%				mg					
	liście- nie coty- ledons	liście leaves	hypo- kotel hypo- cotyle	korze- nie roots	liście- nie coty- ledons	liście leaves	hypo- kotel hypo- cotyle	korze- nie roots	razem total*	
Nasiona przed pęcznieniem Seeds before imbibition Po 3 dniach After 3 days	2.50**								486,6	
„ 6 „	1,96			2,44	343,5			31,5	375,0	2,4****
„ 9 „	1,86	3,37		3,19	284,7	2,7		51,4***	338,8	2,5
„ 12 „	1,93	3,26	3,15	3,12	267,6	22,2	30,2	32,0	352,0	3,1
„ 12 „	1,37	3,05	2,89	3,22	165,3	74,8	44,8	61,2	346,1	2,9
μt (p = 0,05)									51,0	

* Zawartość alkaloidów podana jest po odjęciu ilości tych związków w okrywach nasiennych, wynoszącej około 6,4 mg.

The alkaloid content is given after subtracting the alkaloids in seed coats amounting ab. 6,4 mg.

** Wraz z zarodkiem.

Together with embryo.

*** Wraz z hypokotylem.

Together with hypocotyl.

**** Bibulę badano w dniu sprzętu, w pozostałych kombinacjach po 6 dniach od umieszczenia na niej nasion.

The filter paper was tested on the day of harvest, in other combinations on the 6th day after the placing of seeds for inhibition.

niach, przy czym poza jednym przypadkiem jednakowa we wszystkich rosnących częściach rośliny. Spadek ogólnej ilości alkaloidów w ciągu pierwszych trzech dni doświadczenia jest wynikiem, jak na to wskazuje tabela 9, zmniejszenia się zawartości wszystkich badanych zasad poza lupaniną, której zawartość w tym czasie nawet nieco zwiększyła się. W okresie następnym sumaryczna ilość lupaniny, hydroksylupaniny i a_y ulega mało istotnym zmianom. Pewne zwiększenie wykazuje ilość frakcji o R_f podobnych do R_f oksylupaniny. Wzrost zawartości tej frakcji nastąpił głównie w liścieniach (między 9 a 12 dniem).

W związku z obserwowanymi zmianami ilości alkaloidów w okresie pęcznienia i kiełkowania nasion doświadczenie powtarzano dwukrotnie — w różnym czasie — zwracając główną uwagę na ten właśnie okres. Jednakże — jak wskazują wyniki podane w tab. 10 i 11 powyższe zjawisko nie powtarzało się. Wprawdzie w obu doświadczeniach po skielkowaniu ilość alkaloidów w badanych roślinach jest niższa, jednakże różnice leżą w granicach błędu.

Tabela 9 — Table 9

Zawartość poszczególnych frakcji alkaloidów w 50 roślinach
Content of particular alkaloid fractions in 50 plants

Termin sprzętu Date of harvesting	Części roślin plant parts	Zawartość alkaloidów — mg alkaloid content — mg fractions of				
		lupanine	hydroxy- lupanine	multiflo- rine	alkaloids of R _f of oxylupa- nine	a _y
Nasiona przed pęcz- nieniem Seeds before imbibi- tion		247,1	71,8	67,5	40,2	60,0
Po 3 dniach After 3 days	liścienie cotyledons	284,7	25,0	9,3	14,6	9,9
	korzenie roots	22,5	1,3	1,4	5,2	1,1
	razem total	307,2	26,3	10,7	19,8	11,0
Po 6 dniach After 6 days	liścienie cotyledons	223,4	28,3	14,4	13,9	4,7
	liście leaves	2,2	0,3	ślady	0,2	ślady
	korzenie roots	39,6	5,3	ślady	5,3	1,2
	razem total	265,2	33,9	14,4	19,4	5,9
Po 9 dniach After 9 days	liścienie cotyledons	213,0	22,2	17,5	11,1	3,8
	liście leaves	15,1	2,2	1,2	2,7	1,0
	hypokotyl hypocotyl	22,7	3,1	1,3	1,8	1,3
	korzenie roots	24,2	1,4	1,6	2,0	2,8
	razem total	275,0	28,9	21,6	17,6	8,9
Po 12 dniach After 12 days	liścienie cotyledons	121,3	12,2	6,0	20,5	5,3
	liście leaves	55,1	7,9	4,8	4,6	2,4
	hypokotyl hypocotyl	32,5	7,1	2,0	2,0	1,2
	korzenie roots	45,1	6,1	5,7	2,1	2,2
	razem total	254,0	33,3	18,5	29,2	11,1

Tabela 10 — Table 10

Ciężar roślin i zawartość* w nich alkaloidów (w przeliczeniu na 50 roślin)
Plants weight and alkaloid content (calculated for 50 plants)

(doświadczenie założone 1.VIII.1960 r.)

Termin sprzętu Date of harvesting	Ciężar roślin — g abs.s.m. Plants weight — g abs.d.m.		Zawartość alkaloidów** Alkaloid content	
	przed doś- wiadczeniem before expe- riment	po sprzęcie after harvest	%	mg
Nasiona przed pęcz- nieniem Seeds before imbibi- tion	21,15	21,15	2,46	522
Po 2 dniach After days	21,50	21,25	2,34	499
„ 2 „	20,65	19,55	2,49	482
„ 6 „	21,00	19,85	2,40	476
μt ($p = 0,05$)				49,2

* Analizowano (wraz z okrywą nasienną) powietrznie suchy materiał, ciężar i % zawartości alkaloidów podano w przeliczeniu na absolutnie suchą masę.

Air dry matter (together with seed coats) was analysed, weight and alkaloid percent were calculated on absolute dry matter.

** Udział lupakaniny w ogólnej zawartości alkaloidów w nasionach przed doświadczeniem wynosił 58%, po 4 dniach 63% (nie zmienił się również istotnie w tym okresie udział frakcji o R_f podobnym do R_f oksylupakaniny).

The amount of lupalanine in total alkaloids content in seeds before the experiments was 58%, after 4 days — 63% (at this period the content of the fraction with R_f similar to R_f of oxylupalanine also has not changed significantly).

Tabela 11 — Table 11

Ciężar roślin i zawartość* w nich alkaloidów w przeliczeniu na 50 roślin)
Plants weight and alkaloid content (calculated for 50 plants)

(doświadczenie założone 13.V.1961 r.)

Termin sprzętu Date of harvesting	Ciężar roślin — g abs.s.m. Plants weight — g abs.s.m.		Zawartość alkaloidów Alkaloid content	
	przed doś- wiadczeniem before expe- riment	po sprzęcie after har- vesting	%	mg
Nasiona przed pęcz- nieniem Seeds before imbibi- tion	25,20	25,20	1,85	466
Po 4 dniach After 4 days	23,85	22,95	1,91	438
Po 8 dniach After 8 days	24,05	22,90	2,11	483
μt ($p = 0,05$)				46,3

* Analizowano (wraz z okrywą nasienną) powietrznie suchy materiał, ciężar i % zawartości alkaloidów podano w przeliczeniu na absolutnie suchą masę.

Air dry matter (together with seed coat) was analysed, weight and alkaloid percent were calculated on absolute dry matter.

DYSKUSJA

Jak zaznaczono we wstępie dwa zagadnienia były przedmiotem niniejszych badań: 1. zmiany — głównie ilościowe — alkaloidów w roślinach poczynając od fazy kwitnienia do dojrzenia oraz 2. zmiany w ilości i składzie tych związków w pierwszym okresie rozwoju ontogenetycznego rośliny, tj. w okresie, gdy jest ona heterotrofem.

Wyniki doświadczenia polowego (obciążone większym błędem) w bardzo dużym stopniu pokrywają się z wynikami uzyskanymi w warunkach wazonowych, mimo znacznie intensywniejszego wzrostu łubinu, szczególnie jego pędów bocznych i znacznie większej względnej oraz bezwzględnej zawartości alkaloidów. (Należy zaznaczyć, że początek kwitnienia nastąpił w obu przypadkach w tym samym wieku roślin, cała długość wegetacji była również podobna).

Zbieżność wyników obu doświadczeń przejawia się przede wszystkim w następujących faktach:

1) największy przyrost zawartości alkaloidów przypada na okres po przekwitnięciu pędów bocznych i to okres stosunkowo krótki, bo w przybliżeniu dwutygodniowy (choć 1° pod względem wieku rośliny, na który ten przyrost przypadł, występują kilkudniowe różnice *, 2° pędy boczne — w odróżnieniu od warunków wazonowych — zawiązały dość liczne strąki i ich liście oraz łodygi nie wykazały w tym czasie dalszego zwiększania masy organicznej);

2) ten przyrost ilości alkaloidów przejawia się jedynie w zwiększeniu ich zawartości w kształtujących się strąkach;

3) ogólna ilość badanych zasad w roślinie w późniejszych fazach nie zwiększa się;

4) pod koniec wegetacji w organach wegetatywnych pozostaje minimalna ilość alkaloidów (jeśli nawet uwzględnić straty spowodowane opadaniem liści, to łączna ilość nie przekroczy 15% ogólnej zawartości tych związków w plonie końcowym, tj. tyle procentowo, ile stwierdzono razem w łodygach i liściach dojrzałych roślin w warunkach wazonowych).

Bardzo duże podobieństwo między wynikami obu doświadczeń można również stwierdzić w zmianach ilości poszczególnych frakcji alkaloidowych i stosunków między nimi w strąkach w procesie ich kształtowania.

Na uwagę zasługują następujące podobieństwa:

a) stała dominacja ilościowa lupaniny w strąkach jako całości i zmniejszenie się jej udziału w sumie alkaloidów w łupinach w okresie dojrzwania;

* Trzeba zaznaczyć, że różnice tego rzędu występowały i w innych naszych doświadczeniach zarówno polowych, jak i wazonowych — w zależności od roku badań.

b) znaczny wzrost frakcji hydroksylupaniny, szczególnie w końcowym okresie wegetacji rolin macierzystych;

c) znaczne zwiększenie się w strąkach pędu głównego ilości frakcji zasad o R_f podobnym do R_f oksylupaniny w okresie największego przyrostu sumy alkaloidów w roślinach i zmniejszenie się jej w następnym okresie. Frakcja ta — uwzględniając jej zachowanie w strąkach, w nasionach w stanie spoczynku oraz w liścieniach po skielkowaniu nasion — zasługuje, wydaje się, na bliższą uwagę.

Warto zaznaczyć, że w doświadczeniu polowym stosunki między poszczególnymi alkaloidami w strąkach pędów głównych i bocznych były na ogół podobne (jedyne wyjątek stanowi wyżej omówiona frakcja, zwiększająca się głównie w strąkach pędu głównego).

W badaniach, w których stosowano C^{14} (Birecka 1962) stwierdzono, iż w okresie nawet nieco poprzedzającym maksymalny wzrost ilości alkaloidów w łubinie białym, biosynteza tych związków w liściach pędu głównego jest już minimalna, natomiast pędy boczne odgrywają istotną rolę pod tym względem. Wydaje się więc, że znaczny przyrost alkaloidów w strąkach pędu głównego w okresie między 64 a 77 dniem jest w dużym stopniu wynikiem przemieszczenia się badanych zasad z pędów bocznych (w tym samym czasie i w strąkach tych pędów obserwowano znaczne zwiększenie alkaloidów).

Wyniki badań nasion w stanie spoczynku wykazały, że sumaryczna zawartość w nich alkaloidów nie ulega w tym okresie zmianie. Wg Bysszewskiego (1957) nasiona łubinów po dłuższym przechowywaniu wykazują tendencje do obniżenia zawartości tych zasad. W naszych doświadczeniach nawet przy przechowywaniu w ciągu dwóch lat nasion łubinu białego (por. tab. 5 i 10) nie stwierdzono spadku ogólnej ilości alkaloidów. Na uwagę jednak zasługują zmiany w udziale poszczególnych frakcji alkaloidowych po upływie 5—6 miesięcy od zbioru. Trudno nam wyjaśnić przyczyny tego zjawiska. Jeszcze większą trudność sprawia wytłumaczenie rozbieżności wyników uzyskanych w trzech doświadczeniach z młodymi roślinami. Najistotniejszym elementem metodycznym, różniącym pierwsze doświadczenie od dwóch następnych, jest sposób zabicia i suszenia roślin. Jednakże dokładne sprawdzenie wszystkich próbek, w których materiał był liofilizowany, nie wykazało istotnych strat w czasie suszenia (w przypadkach krótkiego odmrażania się materiału — w przerwach liofilizacji — temperatura była bliska 0°C). Należy zaznaczyć, że wyniki podobnych doświadczeń przeprowadzanych przez szereg autorów są dość sprzeczne. I tak, Sabalitchka i Jungermann (1925) badając alkaloidy u *Lupinus luteus* w czasie kiełkowania stwierdzili zmniejszenie ilości tych związków. W przeciwieństwie do tych autorów Wallebrock (1940) nie stwierdził ubytku alkaloidów w kiełkach hodowanych na świetle. Wg Guilla-

me'a (wg Van der Kuy 1956) *Lupinus mutabilis* w czasie kiełkowania na świetle zmniejsza zawartość tych zasad, natomiast przy kiełkowaniu w ciemności spadek ten nie następuje. Cytowany autor uważa, że w pierwszym przypadku wystąpiło wydzielanie alkaloidów do podłoża. W badaniach nad zmianami zachodzącymi w czasie kiełkowania nasion *Lupinus angustifolius* w warunkach sterylnych (H. T o c z k o i inni 1960), stwierdzono w ciągu 4 dni od początku pęcznienia spadek zawartości alkaloidów, wywołany jedynie przenikaniem ich do pożywki, w następnych natomiast kilku dniach znaczny wzrost ilości tych zasad.

Proces kiełkowania we wszystkich naszych badaniach przebiegał w ciemności, istotnych strat na skutek wydzielenia alkaloidów na zewnątrz w doświadczeniu pierwszym nie stwierdzono (wydaje się bardzo mało prawdopodobne, aby w tym właśnie doświadczeniu czynnik mikrobiologiczny odegrał specjalną rolę). Przyczyn różnic w wynikach dotyczących okresu bezpośrednio po skiełkowaniu między pierwszym i dwoma pozostałymi doświadczeniami nie udało się nam wykryć. Niezależnie od tych niejasności można stwierdzić, że w badanym łubinie białym w ciągu 10 dni po skiełkowaniu — w odróżnieniu od łubinu wąskolistnego (M. T o c z k o i inni 1960, J. D r o e s e i inni 1960) sumaryczna ilość alkaloidów nie ulegała zmianie. Zwiększeniu się ogólnej zawartości tych związków w różnych częściach roślin towarzyszyło jej zmniejszenie w liścieniach.

Jeśli przyjąć, że w okresie między trzecim i dwunastym dniem wzrostu nie występowało przekształcenie lupaniny w związki niealkaloidowe (co oczywiście wymaga sprawdzenia), to można by przypuszczać, iż w tym czasie 1° rośliny nie syntetyzowały lupaniny, 2° ilości tego alkaloidu stwierdzone w kiełku są wynikiem przemieszczania jego z liścieni. Wart podkreślenia jest fakt, że w tym okresie — kiedy roślina była jeszcze głównie heterotrofem — procentowa zawartość alkaloidów w poszczególnych rosnących jej organach była jednakowa i jednocześnie bardzo wysoka. W późniejszych fazach wzrostu stwierdza się pod tym względem duże różnice między organami, które u badanej odmiany w różnych naszych doświadczeniach zawsze wykazywały wartości niższe od tych, jakie stwierdzono w młodych kiełkach.

STRESZCZENIE WYNIKÓW

1. Charakter akumulacji alkaloidów u gorzkiej populacji łubinu białego w czasie wegetacji (od fazy kwitnienia) w warunkach polowych jest podobny do charakteru stwierdzonego u tej populacji w kulturach wazonowych. Największy przyrost ilości tych związków występuje w stosunkowo krótkim okresie, następującym po przekwitnięciu pędów bocznych. Zawartość alkaloidów w późniejszych fazach rozwoju nie ulega zwiększeniu. W końcu wegetacji w organach wegetatywnych pozostaje minimalna tylko ilość tych zasad.

2. W okresie największego przyrostu ilości alkaloidów zawartość w strąkach pędu głównego frakcji o R_f podobnym do R_f oksylupaniny znacznie wzrasta, w następnym zaś okresie ulega zmniejszeniu. Zawartość frakcji hydroksylupaniny w miarę dojrzewania strąków (zarówno pędu głównego, jak i bocznych) stale w nich zwiększa się, jednakże — w przeciwieństwie do lupaniny — udział jej w sumie alkaloidów w nasionach jest mniejszy w tym czasie niż w łupinach.

3. Sumaryczna zawartość alkaloidów w nasionach w ciągu dwuletniego przechowywania nie ulegała zmianie. Stwierdzono natomiast zmiany w ilości poszczególnych frakcji alkaloidowych. Fakt ten wymaga sprawdzenia.

4. Badania nad zmianami zawartości alkaloidów w nasionach w czasie ich pęcznienia i kielkowania dały rozbieżne wyniki: w jednym doświadczeniu wystąpił znaczny ubytek ilości tych związków w ciągu pierwszych 3 dni od początku pęcznienia, w dwóch następnych natomiast — istotnego spadku nie stwierdzono.

5. W ciągu 9 dni wzrostu po skielkowaniu sumaryczna zawartość alkaloidów w roślinach nie ulegała zwiększeniu.

*Katedra Fizjologii Roślin SGGW
Warszawa*

(Wpłynęło dn. 10.1.1962 r.)

SUMMARY

Several experiments were carried out in order to investigate: 1) changes — mainly quantitative — of alkaloids in plants of bitter white lupin beginning from flowering till maturity, 2) qualitative and quantitative changes of alkaloids in the earliest ontogenetic stages of these plants.

Among the facts noted the following are worth emphasizing:

1. The character of alkaloid accumulation in plants grown in field conditions is similar to the character observed earlier with this variety in pot cultures. The greatest increment of these compounds occurs during a relatively short period following the deflorescence of lateral shoots. The total alkaloid content does not increase during the subsequent development stages. At the end of vegetation only a very small amount of these bases can be found in the vegetative plant parts.

2. During the period of the greatest alkaloid accumulation a marked increase of the fraction with R_f similar to the R_f of oxylupanine is found in pods of the main shoots. However the content of this fraction decreases in the subsequent period. The amount of hydroxylupanine fraction in pods (of the main as well as of the lateral shoots) increases constantly in the course of their maturation. In contrast with lupanine, its share in the total alkaloids content in seeds — at that time — is smaller than in the hulls.

3. The total alkaloid content in dormant seeds does not undergo any significant changes during two years storage. However some changes in the quantity of particular alkaloid fractions — after 5—6 months of storage — was noticed. This fact needs further examination.

4. Investigations on alkaloid content in seeds during their imbibition and sprouting gave divergent results. In one experiment a marked decrease of alkaloids was found, in two others — this decrease was not noticed.

5. The total alkaloid content in plants was not increasing during 9 days of growth after sprouting.

LITERATURA

- Birecka H., Szymańska W., Ścibor-Marchocka A., 1960, Acta Soc. Bot. Pol. 29 (2).
- Birecka H., Nalborczyk E., 1961, Biul. Acad. Pol. Sci. ser. biol. 9 (10).
- Birecka H., 1962 — w druku.
- Byszewski W., 1957, Hod. Rośl. Aklim. Nas. 1 (3).
- Droese J., Stawicka D., Toczko M., Niziołek S., Brzeski W., Reifer L., 1960, Acta Bioch. Pol. 7 (4).
- Van der Kuy A., 1956, Bijdrage tot de kennis van alkaloïde vorming bij enkele species van het genus *Lupinus*, S-Gravenhage, dysertacja.
- Latawiec K., 1958 Roczn. N. Roln., 79-A-1.
- Sabalitschka Th., Jungerman C., 1925, Biochem. Z. 163 (445).
- Toczko M., Niziołek S., Ryszka F., Brzeski W., Reifer I., 1960, Acta Bioch. Pol. 7 (2—3).
- Wallebroek J. C. J., 1940, Rec. Trav. Bot. Neerl. 37 (78).
- Wiewiórski M., Reifer I., 1961, Biul. Acad. Pol. Sci. ser. biol. 9 (11).