Biosynteza i przemiany alkaloidów w łubinie wąskolistnym III. Zmiany składu alkaloidów w rozwoju wegetacyjnym roślin

*Biosynthesis and changes of alkaloid content in the blue lupin
(L. angustifolius)*

III. Changes in content of alkaloids in plants during their development

W. BURZYŃSKA, M. TOCZKO W. BRZESKI I I. REIFER

W poprzednich pracach (T o c z k o et al. 1960, D r o e s e et al. 1960) badano zmiany składu alkaloidów we wczesnych stadiach rozwoju łubinu wąskolistnego. Stosując technikę kultur jałowych wykazano, że zdolność syntetyzowania alkaloidów nie występuje w młodych roślinach bezpośrednio po ich wykiełkowaniu, lecz pojawia się dopiero po kilku dniach rozwoju (T o c z k o et al. 1960); zdolność tę wykazują również zarodki izolowane w tym okresie (D r o e s e et al. 1960). Wśród syntetyzowanych alkaloidów w roślinach hodowanych w ciągu 30 dni w kulturach wazonowych obserwowano pojawianie się i bardzo szybki przyrost nie występującej w nasionach i nie zidentyfikowanej frakcji o R_f okso-lupaniny. Frakcja ta została później określona przez W i e w i ó r o w s k i e g o i R e i f e r a (1961) jako frakcja laktamowo-estrowa.

W związku z tymi obserwacjami przeprowadzono dalsze badania nad zmianami jakościowego i ilościowego składu alkaloidów w poszczególnych częściach roślin hodowanych od momentu wykiełkowania do wytworzenia dojrzałych nasion.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem doświadczalnym były rośliny łubinu wąskolistnego hodowane z nasion odmiany „Wielkopolski gorzki” w warunkach polowych. Przebieg rozwoju wegetacyjnego od wysiewu: 1—2 tygodni — wschodzenie, około 7 tygodni — zanikanie liści, 10—12 tygodni — kwitnienie, 16—18 tygodni — dojrzewanie nasion.

Próby polowe (2×15 roślin) pobierano w odstępach co 2—3 tygod-

nie i rozdzielano na następujące części: liście, części zielone, korzenie, łupiny strąkowe i nasiona. Sposób przygotowania materiału roślinnego do analizy był zależny od jego rodzaju i ilości; stosowano następujące postępowanie:

1) próbę połową rozcierano w moździerzu i całość materiału używano do ekstrakcji (liście, części zielone i korzenie młodych roślin);

2) próbę połową zamrażano i odwadniano za pomocą liofilizacji, następnie dosuszano w temperaturze 30°, mielono i całość materiału używano do ekstrakcji (łupiny i nasiona z młodych strąków);

3) z rozdrobnionej próby połowej pobierano próbę laboratoryjną, którą traktowano jak pod 2) i pobierano naważkę materiału w ilości 1–3 g (części zielone i korzenie wyrosłych roślin, łupiny dojrzałych strąków);

4) dojrzałe nasiona mielono i pobierano jednogramową naważkę.

Alkaloidy ekstrahowano chloroformem (Reifer i Niziołek 1957), a następnie rozdzielano je chromatograficznie stosując równocześnie technikę krążkową w n-butanolu nasyconym kwasem solnym i toluenem (Reifer et al. 1959) oraz technikę krążkowo-paskową w układzie n-butanol-kwas solny-woda (8:1:1) (Toczko et al. 1961). Postępowanie takie umożliwiło wyróżnienie i identyfikację następujących frakcji: laktamowo-estrowej (o wartości R_f identycznej z 17-oksolupaniną), angustyfolinowej, lupaninowej i hydroksylupaninowej (o wartościach R_f identycznych odpowiednio z angustyfoliną, lupaniną lub 13-hydroksylupaniną) oraz nieznannej frakcji X (o najmniejszej wartości R_f). Frakcję angustyfolinową identyfikowano ponadto za pomocą reakcji na wodór grupy NH (Frank 1958); jednorodność frakcji lupaninowej sprawdzano w elektroforezie wysokonapięciowej (Reifer 1961).

Poszczególne frakcje alkaloidowe (z wyjątkiem frakcji X występującej w ilościach śladowych) oznaczano nefelometrycznie (Reifer i Niziołek 1959); ich zawartość w analizowanych częściach roślin wyrażano w przeliczeniu na jedną roślinę.

WYNIKI

Na ryc. 1 przedstawione są zmiany bezwzględnej zawartości sumy alkaloidów w roślinie i poszczególnych jej częściach w ciągu całego okresu wegetacji. W młodej roślinie widoczny jest początkowo znaczny ubytek wyjściowej ilości alkaloidów zawartej w nasieniu, ale wkrótce rozpoczyna się ich synteza i nagromadzanie (ryc. 1a). Po 8 tygodniach rozwoju rośliny intensywność tego procesu staje się największa (ryc. 1b) i w ciągu dalszych 4 tygodni nie ulega zmniejszeniu. W 15 tygodniu zawartość sumy alkaloidów w całej roślinie jest 40-krotnie większa niż wyjściowa ilość w jednym nasieniu.

W obserwowanych zmianach ilościowych sumy alkaloidów w roślinie udział liścieni jest nieznaczny (ryc. 1a) i wkrótce spada do zera wraz z zanikiem liścieni następującym jeszcze przed okresem intensywnej biosyntezy. W tym samym czasie zawartość alkaloidów w korzeniach zaczyna powoli się zwiększać i w 12 tygodniu osiąga maksymalną wartość, która jest jednak niewiele większa niż wyjściowa ilość w nasieniu.

Widoczny jest natomiast decydujący udział alkaloidów zawartych w częściach zielonych (ryc. 1b) w porównaniu z ilością gromadzoną w całej roślinie; zawartość alkaloidów w tych częściach wzrasta aż do

Ryc. 1. Zmiany bezwzględnej zawartości sumy alkaloidów podczas rozwoju rośliny. Wyniki w miligramach na roślinę podano oddzielnie: a — dla liścieni (l) i korzeni (k) oraz b — w skali 20-krotnie zmniejszonej dla łupin strąkowych (s) i nasion (n); wyniki dla części zielonych (z) i całej rośliny (r) przedstawiono w obydwu skalach

momentu zawiązywania strąków (12 tygodni), po czym zaczyna gwałtownie zmniejszać się. W tym czasie pojawiają się alkaloidy w łupinach strąków, lecz w miarę dojrzewania ich zawartość spada; bardzo szybkie ich nagromadzanie obserwuje się natomiast w dojrzewających nasionach. W 15 tygodniu udział alkaloidów części zielonych obniżył się z maksymalnej wartości około 90% do 50% ich sumy w całej roślinie, podczas gdy udział alkaloidów dojrzewających nasion przekroczył 40% tej sumy. Stan pełnej dojrzałości osiągnęły nasiona dopiero w 18 tygodniu, ale określenie sumarycznej zawartości alkaloidów w całej roślinie i porównanie udziału poszczególnych części w tej sumie nie było już możliwe ze względu na opadanie liści pod koniec okresu wegetacji.

Na ryc. 2 przedstawione są zmiany w składzie jakościowym alkaloidów w poszczególnych częściach rośliny podczas jej rozwoju. Okazało

się, że trzy frakcje: angustyfolinowa, lupaninowa i hydroksylupaninowa są obecne we wszystkich częściach rośliny w ciągu całego okresu wegetacji. Frakcja laktamowo-estrowa, której nie wykryto w nasionach użytych do wysiewu, pojawia się po 2 tygodniach w młodych roślinkach i występuje we wszystkich rozwijających się częściach do końca okresu

Ryc. 2. Jakościowy skład alkaloidów w poszczególnych częściach rośliny w różnych okresach rozwoju. Frakcje: FEL — laktamowo-estrowa, Ang — angustyfolinowa, La — lupaninowa, HLa — hydroksylupaninowa, X — nie zidentyfikowana

wegetacji; jest ona obecna również w młodych nasionach, ale zanika w miarę ich dojrzewania. Począwszy od okresu kwitnienia (10—12 tygodni) w starzejących się częściach rośliny pojawia się w śladowych ilościach nie zidentyfikowana frakcja X, której nie wykrywa się jednak ani w młodych, ani w dojrzałych nasionach.

Ryc. 3. Dynamika gromadzenia poszczególnych alkaloidów podczas rozwoju rośliny. Wyniki w miligramach na roślinę podano oddzielnie: a — dla całej rośliny we wczesnym stadium rozwoju oraz b — w skali 10-krotnie zmniejszonej dla części zielonych w okresie intensywnej biosyntezy i dla dojrzewających nasion.

Symbole frakcji jak na ryc. 2

Dynamika gromadzenia poszczególnych alkaloidów podczas rozwoju rośliny przedstawiona jest na ryc. 3. Poprzedzając intensywną biosyntezę zmiany w młodej roślinie podano oddzielnie (ryc. 3a), ponieważ przyrost bezwzględnej zawartości sumy alkaloidów w tym okresie (2—6 tygodni) był jeszcze bardzo mały i tylko nieznacznie przewyższał początkowy ubytek w kiełkującym nasieniu. Po porównaniu zmian zawartości poszczególnych frakcji alkaloidowych okazało się, że poziom trzech spośród nich, tj. frakcji lupaninowej, hydroksylupaninowej i angustyfolinowej (występujących pierwotnie w nasieniu) utrzymuje

Ryc. 4. Zmiany względnego udziału poszczególnych alkaloidów w ich sumach (100%) zawartych w częściach zielonych rośliny lub w nasionach w różnych okresach rozwoju. Symbole frakcji jak na ryc. 2

się niemal bez zmian w tym okresie; od początku syntetyzowana jest natomiast frakcja laktamowo-estrowa, a jej zawartość w ciągu rozpatrywanego okresu zwiększa się więcej niż trzykrotnie (od 0,5 do 1,8 mg. na roślinę) osiągając wyższy poziom niż suma pozostałych frakcji. Należy zwrócić uwagę, że niemal cała ilość (około 90%) zsyntetyzowanej

w tym czasie frakcji laktamowo-estrowej zlokalizowana jest w zielonych częściach rośliny.

W dalszych obserwacjach prześledzono nagromadzenie się poszczególnych alkaloidów w częściach zielonych i dojrzewających nasionach (ryc. 3b). Z przebiegu krzywych w okresie intensywnej biosyntezy (6—12 tygodni) widoczne jest, że frakcja laktamowo-estrowa jest istotnie syntetyzowana najwcześniej, natomiast przyrosty pozostałych frakcji rozpoczynają się ze znacznym opóźnieniem. W intensywności gromadzenia poszczególnych alkaloidów w częściach zielonych ujawniają się znaczne różnice: podczas gdy frakcja laktamowo-estrowa gromadzona jest do zawartości 18,5 mg., to angustyfolinowa — tylko do 10,5 mg., zaś lupaninowa — aż do 31,5 mg. Te trzy frakcje osiągają swoje maksymalne poziomy w tym samym czasie (12 tygodni), co odpowiada maksymalnej zawartości sumy alkaloidów w częściach zielonych. Frakcja hydroksylupaninowa zachowuje się inaczej: jej maksymalny poziom (18,5 mg) występuje znacznie później, kiedy zawartość innych frakcji już się zmniejsza.

Gromadzenie alkaloidów w młodych nasionach rozpoczyna się od początku zawiązywania strąków (12 tygodni). Początkowo pojawiają się tutaj wszystkie cztery frakcje z części zielonych, lecz wkrótce zanika całkowicie frakcja laktamowo-estrowa, natomiast zawartość pozostałych zwiększa się równomiernie w miarę dojrzewania nasion (ryc. 3b).

Na ryc. 4 porównano zmiany względnego udziału poszczególnych alkaloidów przyjmując za 100% każdorazową zawartość ich sumy w różnych okresach rozwoju rozpatrywanej części rośliny. Jest widoczne, że najmniejszym zmianom podlega udział frakcji angustyfolinowej; wynosi on przeciętnie około 12% (od 8 do 16%). Najbardziej zmienny jest udział frakcji laktamowo-estrowej (0—68%), a w nieco mniejszym stopniu zmienia się udział frakcji lupaninowej (10—50%) i hydroksylupaninowej (5—39%). Należy zwrócić uwagę, że wczesny okres rozwoju rośliny (0—6 tygodni) charakteryzuje się znaczną zmiennością ilościowego składu alkaloidów mimo stosunkowo nieznacznych zmian bezwzględnej zawartości ich sumy, przy czym obserwuje się w tym czasie wyraźną przewagę frakcji laktamowo-estrowej pojawiającej się w częściach zielonych młodej roślinki. W późniejszym okresie intensywnej biosyntezy i gromadzenia alkaloidów w tych częściach (6—12 tygodni) następuje powtórne przesunięcie w ilościowym składzie sumy alkaloidów, przy czym zaczyna się zmniejszać udział frakcji laktamowo-estrowej na korzyść frakcji lupaninowej oraz — z pewnym opóźnieniem — frakcji hydroksylupaninowej. W końcowym okresie wegetacji (12—18 tygodni) udział frakcji lupaninowej zmienia się już nieznacznie, natomiast dalszemu spadkowi frakcji laktamowo-estrowej towarzyszy synteza frakcji hydroksylupaninowej. Zmiany obserwowane w przypadku

frakcji lupaninowej i hydroksylupaninowej przebiegają w tym ostatnim okresie w sposób bardzo podobny w częściach zielonych i dojrzewających nasionach; wyraźną różnicą jest jednak pojawianie się nie zidentyfikowanej frakcji X w starzejących się częściach zielonych, a z drugiej strony — całkowity zanik frakcji laktamowo-estrowej w dojrziałych nasionach. Ilościowy skład alkaloidów w dojrziałych nasionach jest identyczny jak w nasionach wyjściowych: frakcja lupaninowa stanowi 49%, hydroksylupaninowa — 39% i angustyfolinowa — 12% sumy alkaloidów.

DYSKUSJA

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wskazują, że proces biosyntezy i gromadzenia alkaloidów w roślinie jest poprzedzony znacznym ubytkiem wyjściowej sumy tych związków zawartych w nasieniu, przy czym w stosowanych warunkach rozwoju w uprawie polowej zjawisko to zanika już po 2 tygodniach od wysiewu (ryc. 1a). Występowanie podobnego faktu było już od dawna znane różnym autorom: S a b a l i t s c h k a i J u n g e r m a n n (1925) wyjaśniali początkowy ubytek alkaloidów ich zużywaniem w metabolizmie rośliny. W naszych poprzednich badaniach nad najwcześniejszym stadium rozwoju łubinu wąskolistnego w kulturach wazonowych i kulturach jałowych (T o c z k o et al. 1960), wykazano, że obserwowane zjawisko polega na przenikaniu alkaloidów z kiełkującego nasienia do podłoża; jest ono ograniczone tylko do okresu, w którym młoda roślina nie posiada jeszcze rozwiniętego systemu korzeniowego.

Od momentu uwidocznienia się biosyntezy alkaloidów można wyróżnić trzy fazy w dynamice gromadzenia sumy tych związków w roślinie (ryc. 1b): początkowe narastanie szybkości, następnie równomierne przebieg procesu z maksymalną intensywnością (w okresie tym dzienne przyrosty alkaloidów wykazują wartości równe ich wyjściowej sumie w nasieniu), w końcu stopniowe zmniejszanie się szybkości gromadzenia. Wydaje się, że obserwowane zmiany są funkcją rozwoju rośliny, przy czym najintensywniejsza biosynteza alkaloidów przypada na okres poprzedzający kwitnienie i okres kwitnienia oraz zawiązywania strąków. Przypuszczenia takie były już zresztą wysuwane przez innych autorów (M o t h e s 1959). Interesujący ze stanowiska fizjologii rośliny jest również fakt, że biosynteza alkaloidów dokonuje się w organach wegetatywnych, z których są one następnie przenoszone do formujących się nasion.

Najpełniejszych dotychczas danych doświadczalnych o przekształceniach poszczególnych alkaloidów w rozwoju łubinu wąskolistnego dostarczyły badania K u y a (1956), jednakże w późniejszym okresie różni

autorzy zwracali uwagę na możliwość błędnych informacji w tej pracy w związku z trudnościami metodycznymi jakościowego rozdziału mieszanin alkaloidów łubinowych. W przypadku lupininy wykrywanej przez K u y a istnieją poważne sugestie Wiewiórowskiego i Brat e k (1956), że była to angustyfolina. Występowanie sparteiny w łubinie wąskolistnym zostało również poddane w wątpliwość po przeanalizowaniu przez tych autorów kilku biotypów nasion tego gatunku.

Stosując w niniejszych badaniach metodykę chromatograficznego rozdziału mieszanin alkaloidowych uwzględniono możliwość niejednorodności otrzymywanych frakcji, jednakże wykorzystanie dodatkowych kryteriów identyfikacji (jak ruchliwość elektroforetyczna bądź specyficzne reakcje) pozwoliło — w odróżnieniu od danych K u y a — ustalić nieobecność lupininy i sparteiny, natomiast obecność angustyfoliny zarówno w nasionach, jak i w innych organach łubinu wąskolistnego. Należy zwrócić uwagę, że występująca w zielonych częściach rośliny, a nieobecna w dojrzałych nasionach frakcja laktamowo-estrowa jest mieszaniną kilkuskładnikową (Wiewiórowski i Reifer 1961). Te dwie frakcje: angustyfolinowa i laktamowo-estrowa, obok lupaninowej i hydroksylupaninowej, stanowią główne składniki sumy alkaloidów w roślinie, przy czym ich stosunek ilościowy zmienia się znacznie podczas jej rozwoju.

Prześledzone zmiany zawartości poszczególnych frakcji wskazują wyraźnie na szczególną rolę frakcji laktamowo-estrowej w procesie biosyntezy alkaloidów w łubinie wąskolistnym. Pojawianie się i bardzo szybkie nagromadzanie tej frakcji, określanej poprzednio jako „oksy-lupanina”, wykazano już wcześniej w młodych roślinkach (T o c z k o et al. 1960), jak również w izolowanych zarodkach i liścieniach (D r o e s e et al. 1960). Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wskazują, że frakcja laktamowo-estrowa pojawia się w rozwijających się organach rośliny wówczas, gdy ani lupanina, ani hydroksylupanina nie są jeszcze syntetyzowane (ryc. 3a). Ponieważ w następującym później okresie intensywnej biosyntezy kosztem tej frakcji dokonuje się przyrost lupaniny (ryc. 4), byłoby to zgodne z włączeniem frakcji laktamowo-estrowej do łańcucha biosyntetycznego zaproponowanego przez Wiewiórowskiego i Reifera (1961).

Synteza hydroksylupaniny jest nieco opóźniona w stosunku do poprzednich frakcji: jej maksymalna zawartość w częściach zielonych rośliny (ryc. 3b) zostaje osiągnięta wówczas, gdy poziom innych alkaloidów już obniża się. Wydaje się możliwe, że ten alkaloid jest wytwarzany nie tylko w częściach zielonych, lecz również w dojrzewających nasionach, w których kosztem frakcji laktamowo-estrowych zwiększa się jego udział w sumie alkaloidów w tym czasie, gdy udziały frakcji angustyfolinowej i lupaninowej nie ulegają większym zmianom (ryc. 4).

Fakt osiągania maksymalnych poziomów bezwzględnej zawartości przez frakcję laktamowo-estrową, angustyfolinową i lupaninową w zielonych częściach roślin w tym samym czasie (ryc. 3b) zdaje się wskazywać na prawdopodobieństwo bliskiego powiązania metabolicznego tych trzech frakcji. Z drugiej strony zwraca uwagę względnie stały udział frakcji angustyfolinowej w sumie alkaloidów w okresie wegetacji rośliny (ryc. 4). Zagadnienie roli angustyfoliny w biosyntezie alkaloidów łubinowych jest przedmiotem dalszych badań (Reifer et al. 1962).

Katedra Biochemii SGGW
Warszawa
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN

(Wpłynęło dn. 6.II.1962 r.)

SUMMARY

1. The qualitative and quantitative changes in the content of various alkaloid fractions in plants during their development were investigated.

2. After an initial decrease in total alkaloids the biosynthesis was observed. The alkaloids accumulated in the green parts and after flowering they were partly transferred to the pods and then to the seeds.

3. A "lactam-ester" fraction which is not present in the seeds was first synthesised in the green parts.

4. During the period of most rapid biosynthesis of alkaloids the ratio of the "lactam-ester" fraction to the lupanine and hydroxylupanine fractions was gradually changed towards the latter. The peak of hydroxylupanine synthesis appeared later than that of lupanine.

5. The fractions of "lactam-esters", angustifoline and lupanine seem to be metabolically related.

Department of Biochemistry,
Central College of Agriculture, Warsaw
Institute of Biochemistry and Biophysics,
Polish Academy of Sciences

LITERATURA

- Droese J., Stawicka D., Toczko M., Niziołek S., Brzeski W., Reifer I., 1960, Biosynteza i przemiany alkaloidów w łubinie wąskolistnym, II. Biosynteza alkaloidów w izolowanych zarodkach i liścieniach, *Acta Biochim. Polon.* 7: 459—468.
- Franck B., 1958, Sedum-Alkaloide II, Alkaloide in *Sedum acre* und verwandten Sedumarten, *Chem. Ber.* 91: 2803—2818.
- Kuy A., van der, 1956, Bijdrage tot kennis van alkaloide-vorming bij enkele species van het genus *Lupinus*, Proefschrift, Univ. Leiden.
- Mothes K., 1959, Physiology of alkaloids, *J. Pharm. Pharmacol.* 11: 193—210.
- Reifer I., 1961, Separation of lupin alkaloids by high voltage electrophoresis, *Bull. Acad. Polon. Sci. s. sci. biol.* 9: 157—160.

- Reifer I., Niziołek S., 1957, Kolorymetryczna metoda oznaczania alkaloidów w nasionach łubinu, *Acta Biochim. Polon.* 4: 165—180.
- Reifer I., Niziołek S., 1959, A nephelometric microdetermination of lupin alkaloids, *Bull. Acad. Polon. Sci. s. sci. biol.* 7: 485—489.
- Reifer I., Przedziecka J., Kleczkowska D., 1959, Chromatograficzna metoda ilościowego oznaczania alkaloidów łubinowych, *Acta Biochim. Polon.* 6: 17—24.
- Reifer I., Wiewiórowski M., Niziołek S., Stawicka D., Bratek D. M., 1962, Biogenesis of lupin alkaloids, II. The interconversion of exogenous alkaloids in *Lupinus angustifolius*, Some experimental data on the hydroxylupanine ester fraction, *Bull. Acad. Polon. Sci. s. sci. biol.* 10: 161—166.
- Sabalitschka Th., Jungermann C., 1925, Der absolute und prozentuale Alkaloidgehalt der einzelnen Teile von *Lupinus luteus* L. während der Vegetation, *Pharmazeut. Zentralhalle* 163: 445—456.
- Toczko M., Brzeski W., Droese J., 1961, Microbial degradation of lupanine, III. Alkaloid intermediates, *Bull. Acad. Polon. Sci. s. sci. biol.* 9: 447—451.
- Toczko M., Niziołek S., Ryszka F., Brzeski W., Reifer I., 1960, Biosynteza i przemiany alkaloidów w łubinie wąskolistnym, I. Zmiany składu alkaloidów we wczesnych stadiach rozwoju roślin, *Acta Biochim. Polon.* 7: 203—213.
- Wiewiórowski M., Bratek M. D., 1956, Die qualitative Zusammensetzung der Lupinenalkaloide im Lichte chromatographischer Untersuchungen, *Abhandl. Dtsch. Akad. Wiss. Kl. Chem. Geol. Biol.* 7: 79—87.
- Wiewiórowski M., Reifer I., 1961, Biogenesis of lupin alkaloids, I. New aspects regarding the biosynthetic chain in *Lupinus angustifolius* and *Lupinus albus*, *Bull. Acad. Polon. Sci. s. sci. biol.* 9: 441—445.